

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO**

MANUELA SOZO CECCHINI

**EFEITO DA HOMOCISTEÍNA SOBRE A EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CICLO CELULAR E À
DIFERENCIAÇÃO NEURAL DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE *Gallus domesticus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Evelise M. Nazari.

FLORIANÓPOLIS

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cecchini, Manuela Sozo

Efeito da homocisteína sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e à diferenciação neural durante o desenvolvimento de *gallus domesticus* / Manuela Sozo Cecchini ; orientadora, Evelise Maria Nazari - Florianópolis, SC, 2015.

92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

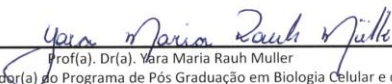
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Proliferação celular. 3. Sistema nervoso central. 4. Ultraestrutura. 5. Desenvolvimento. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

"Efeito da homocisteína sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e à diferenciação neural durante o desenvolvimento de *Gallus domesticus*"

Por

Manuela Sozo Cecchini

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (020/PPGBCD/2015) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.


Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Muller
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



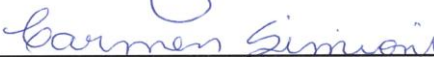
Dr(a) Evelise Maria Nazari (BEG/CCB/UFSC)
Orientador(a)



Dr(a) Karoline Kobus Bianchini (CEFID/UDESC)



Dr(a) Geison de Souza Izídio (BEG/CCB/UFSC)



Dr(a) Carmen Simioni (Pós-doutorado PPGBCD/CCB/UFSC)

Florianópolis, 07 de agosto de 2015.

*Dedico este trabalho ao homem da minha
vida: meu pai!*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero deixar registrado meu sincero agradecimento à minha querida e dedicada orientadora Evelise Nazari. Obrigada pela oportunidade de estagiar em seu laboratório desde a época da iniciação científica, e por ter me guiado e proporcionado permanecer até hoje. Obrigada pela confiança depositada em mim, pela paciência, disposição e por entender minhas limitações. Todo este tempo que passei no laboratório foi enriquecedor e contribuiu muito para minha formação.

À professora Yara Maria Rauh Muller pela dedicação e comprometimento com o nosso laboratório e com o Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

À Karoline Kobus Bianchini pela disponibilidade e ensinamentos logo que cheguei ao laboratório.

Aos técnicos dos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia pelo auxílio nas técnicas.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e à estagiária Thais pelo auxílio no uso dos equipamentos.

À empresa Tyson do Brasil, pela doação dos ovos fertilizados.

Aos integrantes do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, o ‘povo’ do camarão e do zebrinha, pela troca de experiências, ensinamentos e momentos de descontração. Um agradecimento especial ao grupo das aves, pela parceria na obtenção e divisão dos ovos.

Ao Gilian, Maria Luisa e Mariana, pelo apoio nos experimentos, pela troca de experiências, histórias compartilhadas e por me proporcionarem boas risadas!

À Eliane, Heloisa e Fabiana pela amizade, convivência, disponibilidade e pelos momentos divertidos no nosso dia a dia.

Às minhas amigas da época da graduação Ana e Paulinha. Obrigada pela convivência durante todos esses anos, pelas conversas, dúvidas compartilhadas, pelas tentativas de encontros frustrados, pelos desabafos e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha família, em especial meus pais José Carlos e Inês pelo investimento, zelo e apoio incondicional. À minha irmã Camila pela preocupação, carinho e dedicação. Obrigada de coração!

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Elevados níveis do aminoácido homocisteína (Hcy) são caracterizados como uma desordem metabólica denominada – hiperhomocisteinemia, a qual está envolvida com a ocorrência de anomalias congênitas. No sistema nervoso central (SNC) especificamente, esta condição está associada ao dano ao DNA, citotoxicidade neuronal, estresse oxidativo e prejuízo na síntese de neurotransmissores. Neste estudo, foi avaliado o efeito da dose alta de Hcy sobre a expressão das proteínas do ciclo celular, diferenciação e sobrevivência neural. Adicionalmente, investigamos o efeito da Hcy sobre a ultraestrutura das células do mesencéfalo em embriões de *Gallus domesticus*. Para tal, os embriões foram tratados com 48 horas de incubação (E2) onde foram organizados dois grupos experimentais: controle - 50 µl salina e Hcy - 20 µmol Hcy/50 µl salina. Os embriões foram analisados em duas idades – E6 e E10. Através da técnica de imuno-histoquímica, verificou-se uma redução significativa da proliferação celular na camada endimária do mesencéfalo nos embriões em E6. A avaliação da expressão das demais proteínas envolvidas no ciclo celular como p53, p21, ciclina E e PCNA foi realizada pela combinação das técnicas de citometria de fluxo e imuno-histoquímica. O tratamento com Hcy induziu um aumento na expressão da proteína p53, e uma diminuição na expressão das proteínas p21 e ciclina E. Para as proteínas envolvidas no processo apoptótico, como BCL2 e BAK, não foram encontradas diferenças significativas nas duas idades analisadas. Na análise da diferenciação neural encontramos um aumento significativo na expressão da proteína GFAP em E6, o que caracterizamos como um processo de resposta celular denominado gliose reativa. Porém, esta resposta foi normalizada nos embriões na idade E10. Para a análise de sobrevivência neural, houve uma redução na expressão de BDNF e GDNF nos embriões expostos à Hcy na idade de E6. Por fim, através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, a análise ultraestrutural das células revelou alterações relacionadas ao espaço perinuclear e a formação anômala de membrana nos embriões expostos à Hcy nas idades de E6 e E10. Os resultados demonstram que, embora a Hcy não tenha induzido anomalias congênitas aparentes no SNC, o tratamento comprometeu os processos de proliferação celular, diferenciação glial e sobrevivência neural em *G. domesticus*.

Palavras-chave: proliferação celular, embriões de galinha, desenvolvimento, sistema nervoso central, ultraestrutura.

ABSTRACT

High levels of amino acid homocysteine (Hcy) are characterized as a metabolic disorder named hyperhomocysteinemia, which is related to the occurrence of congenital anomalies. Specifically in the nervous system (CNS), this condition is associated with DNA damage, neuronal cytotoxicity, oxidative stress and impaired neurotransmitter synthesis. This study evaluated the effect of Hcy on the expression of cell cycle proteins, neuronal differentiation and survival. Additionally we investigated the effect of Hcy on the ultrastructure of midbrain in embryos aged E6 and E10. Thus, fertilized eggs of *Gallus domesticus* were treated at 48 hours of incubation (E2). Two experimental groups were organized: Control - 50 μ l saline and Hcy - 20 μ mol Hcy/50 μ l saline. Embryos were analyzed at two embryonic ages – E6 and E10. Immunohistochemistry showed a significant reduction in expression cell proliferation in the ependymal layer of the midbrain at E6. Evaluation of expression of the other proteins involved in cell cycle such as p53, p21, cyclin E and PCNA were performed by the combination of flow cytometry and immunohistochemistry Hcy treatment induced an increase in p53 expression, and a decrease in the expression of the proteins p21 and cyclin E. Proteins involved in apoptosis, as BCL2 and BAK, not showed significant differences in both ages examined. The analysis of neural differentiation found a significant increase in protein expression GFAP at E6, which characterized as a process of cellular response termed reactive gliosis, but this response was standardized at E10. The quantification of the proteins neuronal survival BDNF and GDNF were quantified by flow cytometry and a significant reduction was found in embryos exposed to Hcy at E6, and this pattern is reversed at E10. Finally, by technique of transmission electron microscopy, the ultrastructural analysis of the cells showed changes related to the perinuclear space and the anomalous formation of membrane in embryos exposed to Hcy at E6 and E10. The results demonstrated that although Hcy did not induce congenital anomalies in the CNS, the treatment impaired the cellular processes of proliferation, differentiation glial and neuronal survival in *G. domesticus*.

Keywords: cell proliferation, chicken embryos, development, central nervous system, ultrastructure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Micrografia eletrônica da formação do tubo neural.....	24
Figura 2:	Representação esquemática do desenvolvimento das vesículas encefálicas.....	26
Figura 3:	Representação da organização do córtex encefálico durante o desenvolvimento.....	27
Figura 4:	Neurogênese no embrião de ave.....	29
Figura 5:	Desenho experimental do estudo.....	36
Figura 6:	Representação da análise quantitativa das marcações celulares.....	41
Figura 7:	Representação esquemática da metodologia.....	43
Figura 8:	Cortes sagitais do mesencéfalo em embriões E6 submetidos à coloração HE.....	45
Figura 9:	Cortes sagitais do mesencéfalo em embriões E10 submetidos à coloração HE.....	46
Figura10:	Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-fosfo-histona H3 em embriões E6.....	47
Figura11:	Imunolocalização e quantificação da proteína p21 por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.....	48
Figura12:	Imunolocalização e quantificação da proteína p53 por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.....	49
Figura13:	Imunolocalização e quantificação da proteína PCNA por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.....	50
Figura14:	Imunolocalização e quantificação da proteína ciclina-E por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.....	51
Figura15:	Imunolocalização e quantificação da proteína β -tubulina III por imuno histoquímica e citometria de fluxo em embriões E6.....	52
Figura16:	Quantificação da proteína β -tubulina III por citometria de fluxo em embriões de idade E10.....	53
Figura17:	Imunolocalização e quantificação da proteína GFAP por imuno-histoquímica e citometria de fluxo em embriões de idade E6.....	54
Figura18:	Quantificação da proteína GFAP por citometria de fluxo em embriões de idade E10.....	55

Figura 19:	Imunolocalização e quantificação da proteína BDNF por imuno-histoquímica e citometria de fluxo em embriões de idade E6.....	56
Figura 20:	Quantificação da proteína BDNF por citometria de fluxo em embriões de idade E10.....	56
Figura 21:	Quantificação e imunolocalização da proteína GDNF por citometria de fluxo e imunohistoquímica em embriões E6.....	57
Figura 22:	Quantificação da proteína GDNF por citometria de fluxo em embriões de idade E10.....	58
Figura 23:	Quantificação da expressão das proteínas BCL2 e BAK por citometria de fluxo em embriões E6.....	59
Figura 24:	Quantificação da expressão das proteínas BCL2 e BAK por citometria de fluxo em embriões E10.....	60
Figura 25:	Eletromicrografia da camada do endodermia no mesencéfalo de embrião de <i>G. domesticus</i> em idade de E6.....	62
Figura 26:	Eletromicrografia da camada do manto no mesencéfalo de embrião de <i>G. domesticus</i> em idade de E6.....	63
Figura 27:	Eletromicrografia da camada do manto no mesencéfalo de embrião de <i>G. domesticus</i> em idade de E6.....	64
Figura 28:	Eletromicrografia da camada marginal no mesencéfalo de embrião de <i>G. domesticus</i> em idade de E6.....	65
Figura 29:	Eletromicrografia ultrafinas do mesencéfalo de embrião de <i>G. domesticus</i> em idade E10.....	66
Figura 30:	Quantificação e localização de compartimentos autofágicos por citoquímica e citometria de fluxo em embriões E6.....	68
Figura 31:	Quantificação e localização de compartimentos autofágicos por citoquímica e citometria de fluxo em embriões E10.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Anticorpos primários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo.....	39
Quadro 2:	Anticorpos secundários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo.....	40
Quadro 3:	Interferência de elevados níveis de Hcy na expressão de proteínas do ciclo celular, diferenciação neural, sobrevivência neural e citotóxica para autofagia.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Aldh1L1	Enzima metabólica aldeído desidrogenase 1
AF	Ácido Fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAK	do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i>
BCL2	do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CBS	Cistationa β -sintetase
Cdk	do inglês <i>cyclin-dependent kinases</i>
DAB	do inglês 3,3'- <i>Diaminobenzidine</i>
DAPI	do inglês 4',6'- <i>Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
DLHPS	Ponto de articulações dorsolaterais, do inglês <i>dorsolateral hinge points</i>
DTN	Defeito do Tubo Neural
EGF	Fator de crescimento epidermal, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto, do inglês <i>fibroblast growth factor</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado da glia, do inglês <i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
Hcy	Homocisteína, do inglês <i>homocysteine</i>
IDR	Ingestão dose recomendada
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHP	Ponto de articulação mediano, do inglês <i>median hinge point</i>
MS	Metionina Sintetase
MTHF:	5-metiltetraidrofolato

NeuN	do inglês, <i>neuronal nuclei</i>
NGF	Fator de crescimento do nervo , do inglês <i>nerve growth factor</i>
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Placa Cortical
PCNA	do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PP	Pré Placa
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TN	Tubo Neural
ZI	Zona Intermediária
ZM	Zona Marginal
ZSV	Zona Subventricular
ZV	Zona Ventricular

Sumário

1.Introdução.....	21
1.1 Metabolismo da Homocisteína.....	21
1.2 Formação do Sistema Nervoso Central em Vertebrados.....	23
1.3 Linhagens Celulares do Sistema Nervoso Central.....	28
1.4 Hiperhomocisteinemia Durante o Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	31
1.5 Modelo Experimental.....	32
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. Material e Métodos.....	35
3.1 Ovos e embriões de <i>Gallus domesticus</i>	35
3.2 Grupos experimentais.....	35
3.3 Análise por Microscopia de Luz.....	36
3.4 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).....	37
3.5 Citoquímica para Autofagia.....	37
3.6 Técnica de Imuno-histoquímica.....	37
3.7 Estereologia das Marcações Celulares.....	40
3.8 Citometria de Fluxo.....	41
3.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	42
3.10 Análise Estatística.....	42
4. Resultados.....	45
4.1 Análise Microscópica do Mesencéfalo.....	45
4.2 Análise de Proliferação Celular.....	46
4.3 Análise de Diferenciação Neuronal.....	52
4.4 Análise de Diferenciação Glial.....	53
4.5 Análise de Sobrevivência Neural.....	55
4.6 Análise de Apoptose.....	58
4.7 Análises Ultraestruturais do Mesencéfalo de <i>Gallus domesticus</i>	61
4.7.1 Epêndima.....	61
4.7.2 Camada do Manto.....	62

4.7.3 Camada Marginal.....	64
4.7.4 Análise Ultraestrutural em Embriões E10.....	66
4.8 Análise para Autofagia.....	67
5. Discussão.....	71
6. Conclusões.....	79
7. Referências Bibliográficas.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo da Homocisteína

No final da década de 1960, o médico patologista Kilmer McCully (1969) em um estudo de caso, relacionou pela primeira vez que níveis elevados do aminoácido homocisteína (Hcy – do inglês *homocysteine*) estariam associados a lesões arteriais. Neste estudo, a análise do plasma sanguíneo dos pacientes afetados mostrou um elevado índice de Hcy, que foi relacionado posteriormente com as lesões encontradas nas artérias destes pacientes. Posteriormente, os estudos de McCully, Wilcken & Wilcken (1976) confirmaram esses achados ao diagnosticar que elevados índices de Hcy afetariam também o metabolismo da metionina, levando a complicações coronarianas.

Esses trabalhos acima citados serviram como subsídios para futuras pesquisas, e hoje, quase cinquenta anos depois, diversos estudos epidemiológicos e experimentais demonstram que níveis elevados deste aminoácido estão ligados a uma gama ainda maior de doenças e anomalias congênitas. Dentre essas últimas podemos citar anomalias cardíacas, de face, membros e do sistema nervoso central (SNC), como apresentado na revisão proposta por Van Mil et al. (2010). Mais recentemente, pesquisas tem demonstrado a associação de Hcy com a doença de Alzheimer (Hinterberger & Fischer 2013), depressão (Young 2007), demência e perdas cognitivas (Dangour et al. 2010).

Os elevados níveis de Hcy são caracterizados como uma desordem metabólica denominada – hiperhomocisteinemia, a qual está envolvida em diversos processos patológicos (Selhub 2008). A homocisteína é um aminoácido não constituinte de proteínas, formado unicamente pela metionina derivada da dieta, através da junção de duas importantes vias metabólicas, transulfuração e remetilação (Selhub 2008). Na via de transulfuração a Hcy é convertida em cisteína pela ação da enzima cistationa β -sintetase (CBS), que requer a presença de vitamina B6 como co-fator enzimático (De La Calle et al. 2003). Já a reação de remetilação, requer a atividade da enzima metionina sintetase (MS) que adiciona grupamentos metil à Hcy, sintetizando metionina novamente, sendo que esta reação é dependente da presença de ácido fólico (AF) (Bottiglieri 2005; Obeid & Herrmann 2006). A conversão da homocisteína em cisteína ou metionina pelas vias acima citadas, garante que a concentração de Hcy alcance níveis toleráveis no organismo, que devem variar de 5-15 μ mol (Ueland et al. 1993).

Diversos fatores são decisivos para o aumento da concentração plasmática de Hcy, como por exemplo, fatores fisiológicos, estilo de vida, uso de medicamentos entre outros. Porém, principalmente os fatores genéticos como os defeitos associados à enzima cistationa β sintetase e os fatores nutricionais, como a deficiência na ingestão de AF são determinantes no desenvolvimento de hiperhomocisteminemia (Saw et al. 2001). Dados da literatura comprovam esta relação de ingestão de AF com a redução dos níveis de Hcy (Rosenquist et al. 1996; Kobus et al. 2009; Oosterbaan et al. 2012).

A principal fonte de incorporação de AF é proveniente da dieta, visto que os animais não possuem a capacidade de sintetizá-lo. Na natureza, este grupo de vitaminas é encontrado em vegetais verdes folhosos, frutas cítricas, laticínios, fígado, leveduras (Lucock 2000) e ao serem ingeridos permanecem na forma inativa, necessitando de ativação por meio de reações bioquímicas. Desta forma, através de reações enzimáticas, estes compostos são convertidos na sua forma ativa e mais comumente encontrada nos tecidos, o 5-metiltetrahidrofolato (MTHF), que participa das reações de remetilização da Hcy ao atuar como doador de grupamentos metil para a formação da metionina (Miller 2008).

A suplementação por vitaminas que atuam como cofatores enzimáticos nas vias citadas acima, principalmente o AF, tem reduzido significativamente os riscos associados à hiperhomocisteminemia, especialmente no que se refere às anomalias do sistema nervoso central (SNC) (Smithells et al. 1981). Este fato levou a importantes mudanças em políticas públicas de saúde. No Brasil, por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com AF através da resolução (RDC-Anvisa nº 344/2002), onde cada 100 g do produto deve fornecer 150 mcg de AF, o que representa 37% da ingestão diária recomendada (IDR) no adulto (400 mcg) (Guia Alimentar - Brasil; 2005).

O acúmulo intracelular de Hcy compromete diretamente a via biosintética da metionina devido a não remetilização de Hcy à metionina. Esta via é essencial para o fornecimento de grupamentos metil em diversas reações, como a síntese e reparo do DNA, e na ativação de outras biomoléculas como lipídios e neurotransmissores. Como resultado, o excesso de Hcy induz a diferentes alterações celulares, como a parada do ciclo celular e seu consequente comprometimento na proliferação, afeta a composição de fosfolipídios, a estrutura de membranas, leva ao estresse oxidativo, dano ao DNA e apoptose (Mattson & Shea 2003; Sachdev 2005; Reynolds 2006; Bourckhardt et al. 2015).

Considerando que os elevados níveis de Hcy durante o desenvolvimento embrionário estão relacionados a danos celulares e à ocorrência de anomalias do SNC, faz-se necessário compreender o processo de formação do tubo neural (TN) e do SNC, para poder interpretar adequadamente os efeitos celulares da Hcy e sua relação com estas anomalias.

1.2 Formação do Sistema Nervoso Central em Vertebrados

Nos embriões de vertebrados, o desenvolvimento do SNC inicia com o processo de neurulação, onde a partir da especificação e espessamento do ectoderma em ectoderma neural deriva-se a placa neural e posteriormente o tubo neural (Schoenwolf & Smith 1990). A formação do tubo neural tem início quando as células do ectoderma neural organizam-se em uma placa plana ao longo da superfície dorsal do embrião, estas células mudam seu comportamento, tornando-se colunares, facilitando assim a modelagem da placa neural. Em aves e mamíferos, esta modelagem ou dobramento é possível devido a mudanças no comportamento celular em regiões específicas. As células do ponto de articulação mediano (MHP do inglês – *median hinge point*) formam uma articulação em forma de sulco no fundo do tubo, enquanto as células da placa neural que continuam ligadas ao ectoderma da superfície formam articulações dorsolaterais (DLHPs do inglês – *dorsolateral hinge points*). São estas duas regiões de MHP e DLHP que fornecem ‘força’ para que o TN inicie seu dobramento e posterior fechamento (Smith & Schoenwolf 1997) (Figura 1).

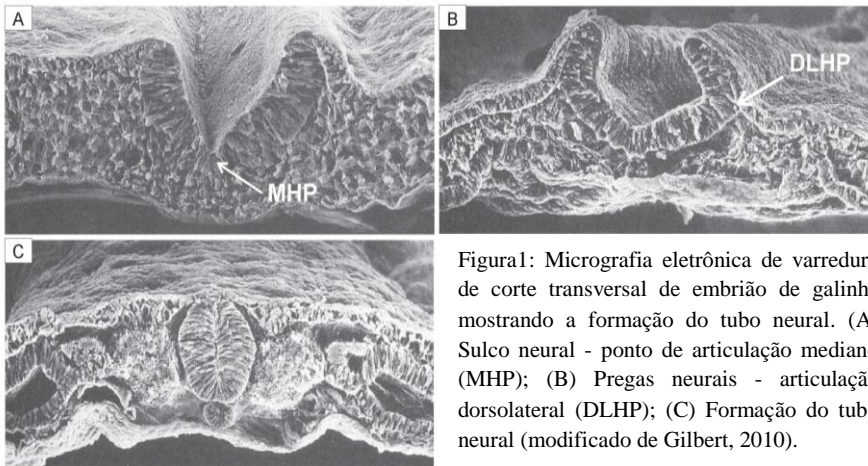


Figura1: Micrografia eletrônica de varredura de corte transversal de embrião de galinha mostrando a formação do tubo neural. (A) Sulco neural - ponto de articulação mediano (MHP); (B) Pregas neurais - articulação dorsolateral (DLHP); (C) Formação do tubo neural (modificado de Gilbert, 2010).

O processo de neurulação difere em algumas características dentro dos grupos animais. No embrião de *Gallus domesticus*, por exemplo, o processo de neurulação se inicia após 20 horas de incubação e termina com cerca de 55 horas de incubação (Hamburger & Hamilton 1951). Ainda neste grupo, a neurulação não ocorre simultaneamente ao longo de todo o eixo corporal do animal, ou seja, a neurulação se dá no sentido céfalo – caudal. Já em mamíferos, o fechamento do tubo tem início em vários locais ao longo do eixo ântero-posterior (Gilbert 2014).

Ao longo do processo de neurulação, as células do ectoderma neural inicialmente expressam caderinas, especialmente E-caderina, uma proteína transmembrana com função de adesão celular. Este tipo de caderina auxilia na movimentação e curvatura das pregas neurais (Shapiro & Colman 1999; Redies 2000). Durante o fechamento do tubo, as células do ectoderma cessam a expressão de E-caderina e passam a expressar a N-caderina, enquanto o ectoderma de superfície continua com sua expressão de E-caderina. Essa expressão diferencial faz com que os tecidos adjacentes (ectoderma da superfície e tubo neural) não se reconheçam e percam a adesividade, o que permite a fusão das pregas neurais e fechamento do TN (Redies 2000; Dady et al. 2012). Com a fusão das pregas neurais, um grupo de células neuroepiteliais – as células da crista neural, perdem sua adesividade e migram para locais específicos. Estas células são responsáveis pela formação do sistema nervoso periférico (SNP) e de outras estruturas da face, pescoço, células pigmentares da epiderme entre outras (Dupin et al. 2000; Gilbert 2014).

Ao final dos eventos anteriormente citados, ocorre a diferenciação anatômica do TN em duas regiões, a porção mais rostral do tubo origina o encéfalo enquanto a porção mais caudal origina a medula espinhal (Colas & Schoenwolf 2001). Além disto, dois importantes eventos ocorrem para permitir a formação de um SNC funcional e maduro. O primeiro refere-se a sua distinção tecidual em camadas/estratos no encéfalo e na medula, e o último leva em conta a diferenciação celular, originando células neuronais e gliais (Gilbert 2014).

O tubo neural recém fechado é constituído por uma única camada de células neuroepiteliais que delimitam o lúmen ventricular. Estas células proliferam continuamente formando um epitélio pseudo-estratificado, e originam os precursores neurais, que se diferenciarão em neurônios e células da glia (glia radial, astrócitos e oligodendrócitos) (Lent 2001). Células neuroepiteliais atuam como células-tronco do SNC devido a duas importantes características, autorrenovação, que é a capacidade da célula se dividir e gerar novas células-tronco com capacidade de nova divisão (no caso do SNC por um número limitado de vezes) e multipotência, pois possuem a competência de gerar células precursoras bipotentes, que podem dar origem a células tanto da linhagem neural quanto glial (Hollyday 2001a). Esta multipotência é resultado de alterações na expressão gênica destas células e liberação de compostos sinalizadores como fatores neurotróficos, entre eles o fator de crescimento epidermal (EGF), e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) (Kolb & Whishaw 2002). A regulação destes compostos sinalizadores é de extrema importância tanto para a manutenção do estado proliferativo e indiferenciado destas células, assim como na sua diferenciação em linhagens neurais (Alvarez-Buylla et al. 2001; Guillemot 2007).

O desenvolvimento, alongamento, e a regionalização do tubo neural na extremidade anterior, promove a formação das vesículas encefálicas primitivas, denominadas prosencéfalo (cérebro anterior), mesencéfalo (cérebro médio) e rombencéfalo (cérebro posterior), onde cada uma dará origem a diferentes partes do encéfalo (Sadler 2007). A partir destas três vesículas primárias formam-se as cinco vesículas secundárias. Assim, o prosencéfalo origina o telencéfalo e o diencéfalo, onde o primeiro constitui os hemisférios cerebrais e a sua cavidade os ventrículos laterais, já o segundo dá origem ao tálamo, hipotálamo e vesículas ópticas. O mesencéfalo não apresenta divisões e sua cavidade se tornará o aqueduto cerebral. Já o rombencéfalo, origina o metencéfalo e o mielencéfalo, onde o primeiro formará o cerebelo e a ponte, e o

segundo formará o bulbo (Bellairs & Osmond 2014; Lent 2005) (Figura 2).

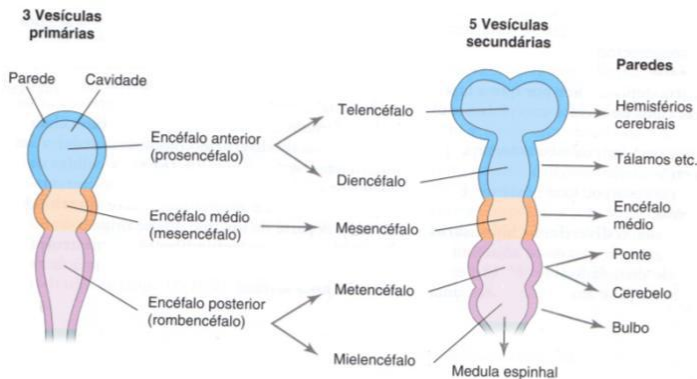


Figura 2:Desenvolvimento das vesículas encefálicas. As três vesículas primárias se subdividem para originar as cinco vesículas secundárias (modificado de Moore & Persaud 2008).

Durante a gênese das células neurais (neurogênese) nas vesículas encefálicas primárias, um dos mais importantes passos para seu desenvolvimento e estratificação em um córtex cerebral funcional, é a geração da diversidade celular que o compõem e sua distribuição em camadas específicas. Para tal, os progenitores celulares passam por sucessivas mitoses. Progenitores neuronais especificamente, passam por divisões assimétricas que geram tanto novos precursores que recomeçam o ciclo, como precursores neurais pós-mitóticos. Estes últimos não se dividem novamente, e iniciam o processo de diferenciação em neurônio jovem durante o movimento migratório para seu local definitivo (Takahashi et al. 1995; Hollyday 2001).

No encéfalo em desenvolvimento, a camada ventricular (posteriormente endimária) é a região que origina aos progenitores neuronais e gliais, neuroblastos e glioblastos, respectivamente. Os neuroblastos, ao cessarem suas mitoses migram perifericamente para formar a camada do manto (ou intermediária) (Schoenwolf 2011). Esta migração é amparada por células já presentes no tubo neural precoce – a glia radial, que por meio de seus prolongamentos fornece substrato para a migração (Rakic 2003). Os neurônios em processo de diferenciação emitem longos axônios a partir da camada do manto criando a zona marginal, que é pobre em corpo celular e rica em prolongamentos celulares. Os processos de proliferação, diferenciação e migração

prossegue, a fim de organizar as camadas celulares que constituirão as camadas definitivas do córtex cerebral maduro (Bystron et al. 2008). Logo que a produção de neurônios cessa, a camada ventricular passa a produzir as células da glia (astrócitos e oligodendrócitos) (Kierszenbaum & Tres 2015). (Figura 3).

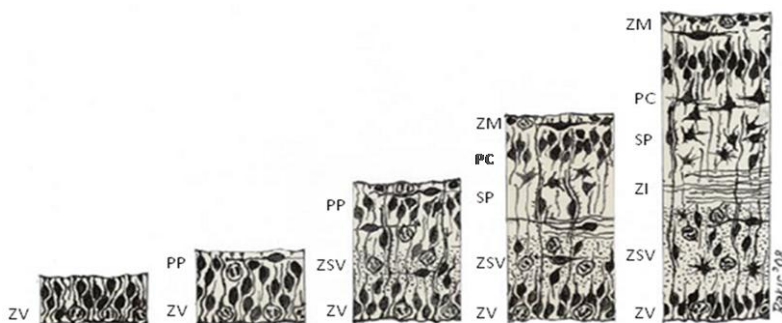


Figura 3: Organização do córtex encefálico durante o desenvolvimento. (ZV) zona ventricular; (PP) pré-placa; (ZSV) zona subventricular; (SP) subplaca; (PC) placa cortical; (ZI) zona intermediária; (ZM) zona marginal (modificado de Bystron et al. 2008).

A interação celular é um fator fundamental durante a migração neuronal. A migração radial, que utiliza a glia radial como guia, é o tipo de migração mais utilizada por neurônios migrantes (Hatten 1999; Campbell & Götz 2002). Além deste tipo de migração, os neurônios podem utilizar outra via que é independente das células da glia – a migração tangencial. Neste tipo de migração, os neurônios movimentam-se paralelamente ao ventrículo, formando um agregado de neurônios migratórios, onde todos se encontram aderidos uns aos outros (Sobeih & Corfas 2002).

Dois fatores parecem influenciar a migração dos neurônios, o local e o momento em que estes foram gerados. Determinados sítios na camada ventricular fornecem um mapa de equivalência para áreas específicas no futuro córtex (Rakic 1988), já o momento em que estes neurônios foram gerados (mais precocemente ou tardiamente) determina o seu tipo de distribuição, onde os neurônios mais jovens dispõem-se na zona ventricular, e os gerados tardiamente são encontrados nas camadas mais superficiais do córtex (Hatten 1999). Sinais presentes na matriz extracelular também atuam a fim de conduzir o neurônio no processo

migratório, estes sinais incluem proteínas como as integrinas, lamininas e relinas, que regulam o movimento, velocidade e a orientação dos neurônios (Sobeih & Corfas 2002).

Ao final do processo migratório, o neurônio já no seu lugar definitivo deve passar por modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais para assumir sua forma madura. No plano morfológico, a emissão de prolongamentos como axônios e dendritos permite a interação com outros alvos celulares. No plano bioquímico, ocorre a síntese de moléculas, enzimas, entre outras proteínas, que permitem o início das atividades elétricas, o que possibilita ao neurônio receber, processar e enviar informações no ambiente que o circunda (Schuurmans & Guillemot 2002; Muotri & Gage 2006).

Durante o processo de neurogênese, o sistema nervoso em desenvolvimento produz um número excedente de neurônios àqueles já encontrados no encéfalo maduro (Pettmann & Henderson 1998). A morte celular programada de neurônios é inerente ao desenvolvimento neural e possibilita a eliminação de células em excesso, além de eliminar os neurônios que não conseguem estabelecer conexões neurais com seus alvos específicos, formando sinapses desnecessárias ou impróprias. Esta morte celular programada torna-se então fundamental para o refinamento neural na citoarquitetura do tecido em desenvolvimento (Oppenheim 1991; Buss et al. 2006).

1.3 Linhagens Celulares do Sistema Nervoso Central

A diferenciação dos progenitores neurais em neurônios e células da glia é resultado de uma ordenada interação entre compostos sinalizadores, fatores de transcrição e alterações na expressão gênica destas células, que irão determinar o seu comprometimento em diferentes perfis celulares (Schuurmans & Guillemot 2002; Muotri & Gage 2006). A geração dos tipos celulares que compõem o encéfalo ocorre em fases temporalmente distintas, mas que se sobrepõe. Neste contexto, neurônios são gerados em primeiro lugar, seguidos por astrócitos e oligodendrócitos (Sauvageot & Stiles 2002) (Figura 4).

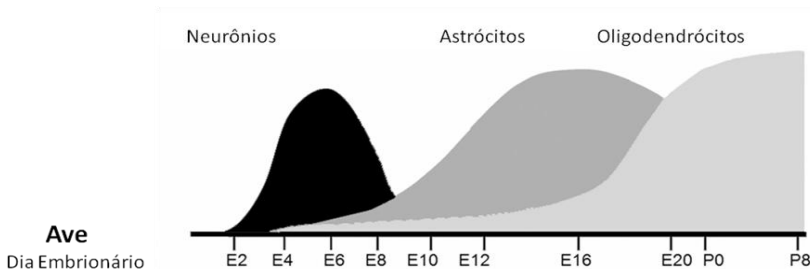


Figura 4: Neurogênese no embrião de ave: sequência temporal do desenvolvimento de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos em embrião de ave. E: dia embrionário; P: dia pós-natal. (modificado de Domowicz et al. 2011).

Após o comprometimento celular de um progenitor neural em um tipo celular específico, este passa a expressar genes que codificam fatores envolvidos na sua biologia e especificação. Células destinadas a se tornarem neurônios, por exemplo, passam a expressar diferentes proteínas, como a proteína nuclear NeuN, Map2 (proteína associada a microtúbulos), α -tubulina e β -tubulina (Mullen et al. 1992; Kintner & Koyano-Nakagawa 2009; Brady et al. 2014). Estas últimas, juntamente com os filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos, exercem várias funções na formação do neurônio, como a diferenciação e alongamento dos prolongamentos neurais e migração durante o seu desenvolvimento (Gozes 1982). Adicionalmente, a expressão de tubulina é considerada essencial em todos os estágios da diferenciação neuronal. Aproximadamente 10% das proteínas totais do cérebro são tubulinas (Brady et al. 2014), sendo que um subtipo especial, a β -tubulina III é considerada um marcador específico para células neuronais (Kirkpatrick & Brady 1999; Katsetos et al. 2003).

A especificação das células neurais em astrócitos requer a expressão da proteína ligante de Ca^{2+} S100 β , Aldh1L1 (enzima metabólica aldeído desidrogenase 1) e da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillar acid protein*). Especificamente, GFAP é o principal tipo de filamento intermediário presente no citoplasma de astrócitos, sejam eles normais, reativos ou neoplásicos, esta proteína por sua vez, esta envolvida na modulação da motilidade e forma dos astrócitos, o que leva a estabilidade dos filamentos astrocíticos (Eng et al. 2000; Cahoy et al. 2008; Yang et al. 2011).

Nas últimas décadas, diversos estudos tem elucidado a participação dos astrócitos na dinâmica do SNC, e seu papel parece ser

tão essencial para o funcionamento deste tecido quanto o do neurônio (Montgomery 1994; Kimelberg 2004; Oberheim et al. 2012). Em estudos recentes, são atribuídas a esta célula a regulação do fluxo sanguíneo cerebral, isolamento elétrico dos neurônios, regulação do metabolismo dos neurotransmissores, controle da sinaptogênese (Sofroniew & Vinters 2010; Oberheim et al. 2012; Clarke & Barres 2013), auxílio na formação da barreira hematoencefálica (Barres 2008). Atuam também em resposta a lesões no SNC, sendo que esta resposta gera uma condição denominada gliose reativa. Durante este processo, os astrócitos passam do estado de quiescência e tornam-se ativados, onde aumentam a produção de GFAP, migram para o local da lesão e liberam mediadores em resposta à reação inflamatória tecidual, a fim de reparar o tecido pós-lesão (Buffo et al. 2010; Pekny et al. 2014).

O desenvolvimento das células do SNC anteriormente citadas é igualmente dependente de fatores de crescimento secretados no tecido nervoso, as chamadas neurotrofinas. Estas atuam como moléculas sinalizadoras, desempenhando papel importante no crescimento, plasticidade neural, diferenciação e sobrevivência neuronal, visto que neurônios sem o aporte adequado de neurotrofinas podem entrar em processo de apoptose (Lewin & Barde 1996; Chao 2003). A família das neurotrofinas consiste nos seguintes membros: neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5), fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Lindsay et al. 1994; Hallböök 1999). Especificamente, BDNF é a neurotrofina mais abundante e mais bem caracterizada que está presente no tecido nervoso, principalmente no que se refere ao seu papel no desenvolvimento axonal e plasticidade sináptica (Kossel et al. 2001; Poo 2001; Cohen-Cory et al. 2010). O efeito do BDNF é mediado pela ligação de alta afinidade ao receptor transmembrana tirosina kinase (TrKB), tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (Huang & Reichardt 2003). Através da análise de RT-PCR, Yao e colaboradores (1994) demonstraram que em embriões de aves, a expressão de BDNF e seu respectivo receptor já estão ativos nos estágios mais precoces do desenvolvimento (dia embrionário E2), o que ressalta a importância desta neurotrofina durante o processo de neurogênese.

A importância de GDNF para as células neurais reside no fato de que esta neurotrofina desempenha um papel protetor e restaurador em processos neurodegenerativos, além de promover a sobrevivência e diferenciação em outras células neurais, como neurônios motores,

sensoriais, células de Purkinje entre outros, mostrando ser um importante mediador na interação neurônio-glia (Oppenheim et al. 1995; Sandhu et al. 2009).

1.4 Hiperhomocisteinemia Durante o Desenvolvimento do SNC

Elevados níveis de Hcy podem afetar o SNC em desenvolvimento. Além dos efeitos comumente relatados como aqueles ligados aos defeitos do tubo neural (DTN), outros parecem ser igualmente relevantes. Esses efeitos incluem citotoxicidade neuronal (Lipton et al. 1997), dano vascular (Oosterbaan et al. 2012), estresse oxidativo (McCully 2009), prejuízo na síntese de neurotransmissores (Bottiglieri 2005) e lipídios (Miller et al. 2003).

Essas alterações podem estar relacionadas aos efeitos que os elevados níveis de Hcy causam na via biosintética da metionina, devido a não remetilização da Hcy nesta molécula (Oikawa et al. 2003). No cérebro especificamente, através da transferência de carbonos a via da metilação é essencial para a síntese de neurotransmissores como serotonina, dopamina e acetilcolina (Bottiglieri 2005). A metilação de resíduos de arginina, proteína básica da composição da mielina também é essencial para a compactação da bainha de mielina em torno do neurônio. Alterações neste processo podem levar à redução da função de condução nervosa (Amur et al. 1986).

Danos ao DNA são frequentemente relatados em condições de acúmulo intracelular de Hcy devido à inibição das reações de transferência dos grupamentos metil, os quais são requeridos na síntese de purinas, timidina na formação de nucleotídeos (Oikawa et al. 2003). O próprio DNA ao ser alterado nestas condições, pode comprometer mecanismos vitais para o desenvolvimento, como a expressão gênica, transcrição e mecanismos epigenéticos, que afetam o crescimento de tecidos, a diferenciação e o reparo (Reynolds 2006).

Durante a neurogênese no SNC, um preciso controle do ciclo celular é indispensável para a fiel replicação de cada célula. Neste controle, sinais intracelulares e extracelulares coordenam a progressão da célula nas fases G1, S, G2 e M ou sua parada em pontos específicos do ciclo, através da atuação de proteínas de ponto de checagem as quais atuam na detecção de danos celulares, seu possível reparo, bem como a ativação da morte celular programada (Liu et al. 2006; Frank & Tsai 2009).

Danos ao DNA decorrentes do acúmulo intracelular de Hcy podem ativar a via da proteína supressora de tumor p53, que opera como

um sensor de dano ao DNA (Bourckhardt et al. 2015). Nesta resposta celular, p53 tem seu nível aumentado e passa a atuar como fator de transcrição para determinados produtos gênicos. A transcrição de genes que codificam para proteína p21 resulta na síntese desta proteína em resposta a ativação de p53 (Joerger & Fersht 2008). Assim, a p21 bloqueia a progressão do ciclo celular até que o dano seja reparado. Caso o reparo não aconteça, a proteína p53 pode ativar a indução de morte celular programada pela inibição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e ativação de pró-apoptóticas Bax e Bak (Miyashita et al. 1994; Zilfou & Lowe 2009).

1.5 Modelo Experimental

A espécie de *Gallus domesticus* destaca-se como um ótimo modelo biológico por apresentar características que facilitam sua utilização em diversos estudos. Os ovos da espécie são de fácil obtenção tanto em quantidade como em custo, seu armazenamento em incubadoras artificiais não requer instalações complexas e podem ser acompanhados diariamente por estarem fora do útero da mãe (Schoenwolf 1995). Além do que, o estagiamento do desenvolvimento embrionário (HH) de *G. domesticus* é de fácil realização, e tem como base os critérios morfológicos estabelecidos por Hamburger e Hamilton (1951).

A estrutura e composição dos ovos de *G. domesticus* é também um fator importante que possibilita o seu desenvolvimento longe da influência da mãe e permite sua incubação artificial. Após a postura, o ovo já contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, inclusive o aporte de oxigênio, que chega até o embrião através dos poros da casca do ovo (Bellairs & Osmond 2014). Além dos aspectos citados, a biologia da espécie está bem descrita, com importantes dados sobre sua embriologia e desenvolvimento, sobretudo em estudos de toxicologia e teratologia (Schoenwolf 1995). Quanto à formação do SNC desta espécie, a neurulação inicia após 20 horas de incubação e termina com cerca de 55 horas de incubação. Antes de concluir o fechamento do tubo neural, as vesículas primárias já podem ser reconhecidas a partir de 33 h de incubação, completando suas subdivisões para formar as cinco vesículas encefálicas secundárias com cerca de 48 h de incubação (Hamburger & Hamilton 1951).

Diante da relevância do tema aqui abordado e considerando a pouca disponibilidade de estudos *in situ* que demonstrem diretamente os

efeitos de como elevados níveis de Hcy interferem na organização dos tecidos, órgãos embrionários e na resposta celular do SNC em desenvolvimento, o presente trabalho propõe o estudo dos efeitos da Hcy sobre os mecanismos celulares e teciduais inerentes ao desenvolvimento do sistema nervoso, utilizando embriões de galinha doméstica, *G. domesticus*, como modelo experimental.

Como base em trabalhos anteriores, a hipótese científica proposta é a de que a Hcy altera o ciclo celular, induzindo a redução na expressão de ciclina E, e ainda, aumento na expressão de p21, p53 e PCNA. Adicionalmente, a Hcy promove alteração na sobrevivência e diferenciação neuronal e glial através da alteração da expressão de β -Tubulina III, GFAP, BDNF e GDNF.

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar o efeito de dose elevada de Hcy sobre os processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência neural durante o desenvolvimento do encéfalo, utilizando embriões de *Gallus domesticus*, como modelo experimental.

2.2 Específicos

- Investigar o efeito do tratamento com Hcy sobre o processo de proliferação celular de neurônios e células da glia, através da análise das proteínas, fosfo-histona H3, ciclina E, p21, p53 e PCNA, relacionadas ao ponto de checagem e progressão do ciclo celular;
- Avaliar a expressão das proteínas Bak (pró-apoptótica) e Bcl2 (anti-apoptótica) em condições de elevados níveis de Hcy;
- Avaliar se o tratamento com Hcy interfere na expressão das proteínas β -tubulina III e GFAP, envolvidas na diferenciação neuronal e glial, respectivamente;
- Investigar o efeito do tratamento com Hcy sobre o processo de sobrevivência neural através da análise das proteínas BDNF e GDNF;
- Analisar as estruturas celulares alvo do tratamento com Hcy, por meio da avaliação ultraestrutural das células dos encéfalos dos embriões;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ovos e Embriões de *G. domesticus*

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados embriões de galinha doméstica da espécie *G. domesticus*, obtidos a partir de ovos fertilizados, cedidos pela Empresa Tyson do Brasil - São José/SC. Os ovos foram transportados ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal CCB/UFSC onde foram higienizados com água destilada, numerados e tiveram sua massa aferida em balança de precisão (g) para verificação da homogeneidade da amostra. O peso médio dos ovos utilizados nos procedimentos descritos a seguir foi de aproximadamente de 68,50 gramas.

No laboratório, os ovos permaneceram em repouso por um período médio de 24 horas a uma temperatura variável de 15 e 20°C, em seguida, foram incubados na posição vertical em incubadora Golden® com condições de temperatura 37,5 °C ($\pm 0,5$ °C) e 65% de umidade, diariamente monitoradas.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o número 175/CEUA/2014.

3.2 Grupos Experimentais

Para contemplar os objetivos deste estudo foram adotados dois grupos experimentais, os quais receberam as doses de Hcy e salina conforme o trabalho de Kobus et al. (2013), como segue:

- Grupo controle: 50 μ L de salina;
- Grupo Hcy: 20 μ mol D,L-Hcy diluídos em 50 μ L salina;

As substâncias foram administradas *in ovo* na idade embrionária de E2 (48 horas de incubação) através de uma pequena abertura na casca e na membrana interna da casca, na região da câmara de ar (parte mais arredondada do ovo). Concluída a realização dos tratamentos, a abertura na casca foi fechada com fita adesiva transparente não tóxica, os ovos recolocados na incubadora e monitorados diariamente para o controle da sobrevivência, até o 6º e o 10º dia embrionário. As idades de análise E6 e E10 foram selecionadas, pois processos de proliferação, diferenciação e migração que são característicos destas idades então em plena

atividade. Na idade de E6 especificamente, o mesencéfalo, vesícula encefálica de interesse, conta com três camadas celulares que se desenvolvem até seis camadas, características da idade de E10. A escolha destas duas idades também nos permite investigar se o tempo decorrido entre E6 e E10 foi o suficiente para o reparo de um possível dano provocado pela Hcy (Figura 5).

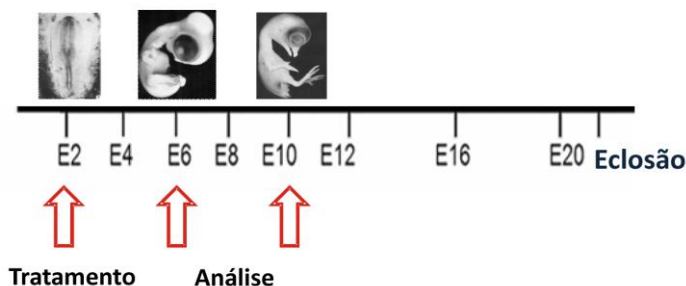


Figura 5: Desenho experimental adotado neste estudo: E2- dia embrionário do tratamento; E6 e E10 – dias embrionários das análises. Fonte: a autora.

Decorrido o tempo de tratamento, os embriões foram dessensibilizados a 4°C por 15 minutos, removidos do ovo e das membranas extraembrionárias e analisados ao estereomicroscópio para confirmação do estágio do desenvolvimento (Hamburger e Hamilton 1951) e para observação de possíveis alterações externas induzidas pelo tratamento com a Hcy.

Para as metodologias de microscopia descritas a seguir, utilizamos apenas mesencéfalo. Já para a análise por citometria de fluxo, utilizamos o encéfalo inteiro por contemplar um número maior de células para esta análise.

3.3 Análise por Microscopia de Luz

Os embriões removidos dos ovos foram fixados em formaldeído a 4% por 24 horas e conservados em etanol 70%. Para a realização das análises microscópicas, os mesencéfalos previamente fixados foram dissecados, desidratados em série etanólica crescente 70% - 100%, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados no micrótomo rotativo (6 µm). Os cortes histológicos foram então dispostos

em série em lâminas de vidro e destinados à técnica de coloração e imuno-histoquímica.

3.4 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas destinadas ao método dicrômico de coloração (HE) foram utilizadas para controle histológico, que visa evidenciar a qualidade da preparação histológica. As secções foram desparafinizadas em dois banhos consecutivos de xilol por 10 minutos cada; re-hidratadas em sequência decrescente de álcool absoluto 100% até álcool 70% por 10 minutos cada. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 8 minutos, embebidas em Hematoxilina de Harris por 1 minuto e 15 segundos, lavadas novamente em água corrente por 10 minutos, imersas em eosina aquosa (1%) e por fim lavadas em água destilada por 5 minutos. Posteriormente, seguiu-se com a desidratação em sequência etanólica crescente, do álcool 70% até álcool absoluto 100% todos por 10 minutos, finalizando com dois banhos consecutivos de xilol por 5 minutos cada. As lâminas foram então montadas com Entelan®.

3.5 Citoquímica para Autofagia

A detecção de células em processo de autofagia foi realizada por citoquímica com o corante laranja de acridina. As secções histológicas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em sequência de álcool 100% - 70%, lavadas em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) 1M (pH 7,4) e imersas no corante laranja de acridina por 15 minutos no escuro. Após, foram lavadas em PBS, finalizadas com meio de montagem Gelmount® acrescido do marcador nuclear fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol) e visualizadas ao microscópio confocal de varredura a laser.

3.6 Técnica de Imuno-histoquímica

Para imunolocalizar nas camadas do mesencéfalo as proteínas envolvidas no ciclo celular, apoptose, diferenciação e sobrevivência neural, as secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas e posteriormente submetidas a 1 banho de 15 minutos de peróxido de hidrogênio 10% em metanol (1 : 2) no escuro para o bloqueio das peroxidases endógenas; em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos PBS 1M (pH 7,4), seguida de 1 banho de 15 minutos em tampão PBS + Triton X- 100® a 0,3% para a permeabilização das

membranas. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com soro fetal bovino (SFB, do inglês *bovine fetal serum*) a 5% com tampão PBS-Triton X-100® a 0,1% por 40 minutos, seguido da incubação com anticorpo primário (Quadro 1) durante 12 horas a 4°C. Decorrido este tempo, as secções foram lavadas três vezes em tampão PBS Triton X-100® a 0,1% por 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário correspondente (Quadro 2) em temperatura ambiente e lavadas em tampão PBS Triton X-100® a 0,1%. Por fim, as secções destinadas para análises colorimétricas em microscopia de luz foram tratadas com solução de 3-3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical) diluído em PBS + peróxido de hidrogênio a 10% para evidenciar as marcações. Ao final, as secções seguiram para desidratação em série etanólica crescente, diafanizadas em xilol e as lâminas finalizadas com meio de montagem Entellan®.

Quadro 1 – Anticorpos primários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo

Anticorpo	Espécie Desenvolvida	Isotipo	Diluição	
			Imuno-histoquímica	Citometria
anti-Fosfo-histonaH3	Coelho	IgG	1:200	-
anti-ciclina E	Coelho	IgG	1:100	1:1000
anti-p21	Camundongo	IgG 1	1:50	1:1000
anti-p53	Coelho	IgG	1:50	1:1000
anti-PCNA	Coelho	IgG	1:100	1:1000
anti-BCL2	Camundongo	IgG 1	-	1:1000
anti-BAK	Coelho	IgG	-	1:1000
anti- β tubulina III	Camundongo	IgG	1:100	1:1000
anti-GFAP	Coelho	IgG	1:50	1:1000
anti-BDNF	Camundongo	IgG 1	1:100	1:1000
anti-GDNF	Coelho	IgG	1:100	1:1000



Ciclo Celular



Apoptose



Diferenciação Neural



Sobrevivência Neural

Quadro 2 - Anticorpos secundários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo

Anticorpo	Isotipo	Diluição	
		Imuno-histoquímica	Citometria
anti-camundongo	IgG	1:200	1:1000
anti-camundongo	IgG 1	1:200	1:1000
Anti-coelho	IgG	1:200	1:1000
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	IgG	1:200	1:1000
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	IgG 1	1:200	1:1000
Anti-coelho Alexa-fluor 568	IgG	1:200	1:1000
Anti-camundongo Alexa-fluor 633	IgG 1	1:200	1:1000



Colorimétrico - conjugado à peroxidase



Fluorescente

3.7 Estereologia das Marcações Celulares

A quantificação das células positivas ao anticorpo fosfohistona H3 foi realizada através do método estereológico, utilizando a Gráticula de Weibel nº 2 – M42 acoplada ao microscópio óptico (1000 X). Nesta contagem de células imunorreativas, foram utilizados 6 campos alternados ao longo do mesencéfalo, onde foram contabilizadas apenas as células que se encontravam localizadas no limite da barra da gráticula ou em cima desta, como mostrado na figura 6. O cálculo da densidade de células positivas por área, foi feito através da fórmula $NA = (\text{número de células positivas} / 36,36) * 0,0004$ (Mandarim-de-lacerda 2003).

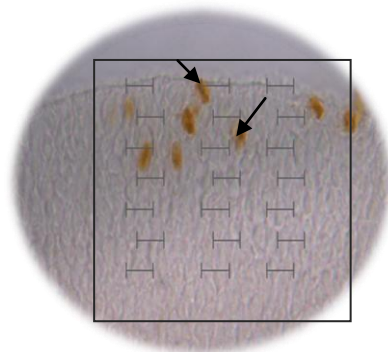


Figura 6: Representação da análise quantitativa das marcações celulares. Posicionamento da graticula de Weibel sobre o corte histológico onde foram centralizadas as células positivas ao anticorpo fosfohistona H3.

3.8 Citometria de Fluxo

Para a quantificação das proteínas, os encéfalos nas idades de E6 e E10 foram dissecados, macerados e submetidos a sete banhos de PBS em agitação e refrigeração. Posteriormente, as células foram dissociadas em tripsina por 30 minutos a 37°C e adicionados 100 μ L de SFB por 30 minutos em agitação. Após, as amostras foram centrifugadas duas vezes a 640 X g por cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e ressuspendido em PBS/SFB 10%. As amostras foram incubadas com anticorpo primário (Quadro 1) durante 1 hora, seguidas da incubação com anticorpo secundário (Quadro 2) por 45 minutos. Para a análise de autofagia, as amostras foram incubadas com o corante laranja de acridina por 10 minutos. As leituras foram feitas no citômetro de fluxo FACS Canto II (LAMEB I/UFSC – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia).

As análises dos dados foram realizadas no programa Flowing Software[®] 2, onde foram analisadas previamente células não marcadas para a determinação da população celular de interesse. Assim, a partir do *dot plot* obtido, avaliando 10.000 células (eventos) e, considerando os parâmetros de dispersão lateral (SSC-A) para a complexidade de células e de dispersão frontal (FSC-A) para o tamanho da célula, as regiões de interesse foram determinadas.

3.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a realização das análises ultraestruturais das células do mesencéfalo, os mesmos foram dissecados, fixados em glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,5% por 48 horas a 4°C. Posteriormente foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a desidratação em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 30 minutos cada. A infiltração das amostras foi realizada em resina Spurr nas proporções de acetona:resina de 2:1, 1:1, 1:2 e resina pura por 24 h cada, seguida de duas infiltrações em resina pura por 12 h e 4 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras infiltradas em resina foram deixadas em estufa a 70°C por 24 h para polimerização da mesma.

Os blocos de resina foram cortados em ultramicrotomo com navalha de vidro para a obtenção de secções semifinas (700 nm - 1 µm), e corados com solução de azul de metileno a 1% e observados ao microscópio de luz para controle da orientação e observação da qualidade do material. As secções ultrafinas (60 - 70 nm) foram realizadas em ultramicrotomo com navalha diamante, coletados em “grids” de 200-300 mesh, contrastados com acetato de uranila a 5% por 25 minutos e citrato de chumbo a 1% durante 5 minutos. As secções foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão, modelo Jeol (JEM)1011 (LCME/UFSC - Laboratório central de Microscopia da UFSC).

3.10 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram analisados no programa Statistica® versão 10.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, foi utilizado o teste t Student.

Abaixo, resumo da metodologia empregada neste estudo.

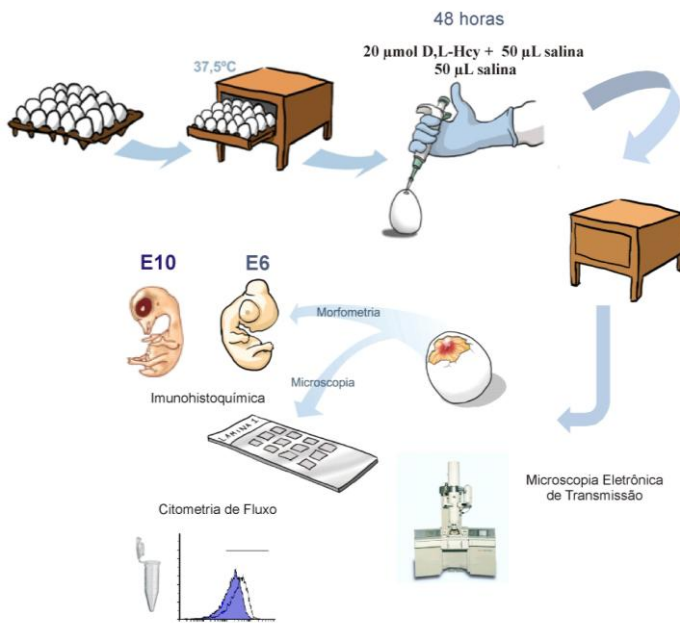


Figura 7: Representação esquemática da metodologia empregada neste estudo. Incubação dos ovos a $37,5^{\circ}\text{C}$ e 65% umidade. A administração das substâncias foi realizada *in ovo* com em 48hrs de incubação, e a análise nas idades de E6 e E10. Os encéfalos foram destinados para as técnicas de imunohistoquímica, citometria de fluxo e microscopia de transmissão.

4. RESULTADOS

Todos os embriões analisados e utilizados nos experimentos descritos neste estudo possuem padrão morfológico normal, tanto para a idade embrionária de E6 e E10, quanto para possíveis alterações morfológicas externas visíveis causadas pelo tratamento com Hcy. Esta análise externa levou considerou o sistema de estagiamento descrito por Hamburger e Hamilton (1951).

Para os embriões em idade de E6, realizamos todas as análises descritas no item 3.0. Porém, considerando que na idade embrionária de E10 os processos celulares de proliferação e diferenciação encontram-se atenuados, e as camadas celulares que compõem o mesencéfalo já encontram-se diferenciadas em seis estratos, optamos por não contemplar a análise das proteínas do ciclo celular nesta idade. Para tal, foram realizadas análises de diferenciação neural, sobrevivência neural, apoptose e autofagia, e a análise ultraestrutural por microscopia de transmissão.

4.1 Análise Microscópica do Mesencéfalo

Para avaliar a morfologia e a qualidade da preparação histológica do mesencéfalo dos embriões, foi realizado o método de coloração hematoxilina-eosina (HE). A análise histológica não evidenciou diferenças na morfologia e na organização das camadas encefálicas dos embriões nas idades de E6 e E10 (Figura 8 e 9).

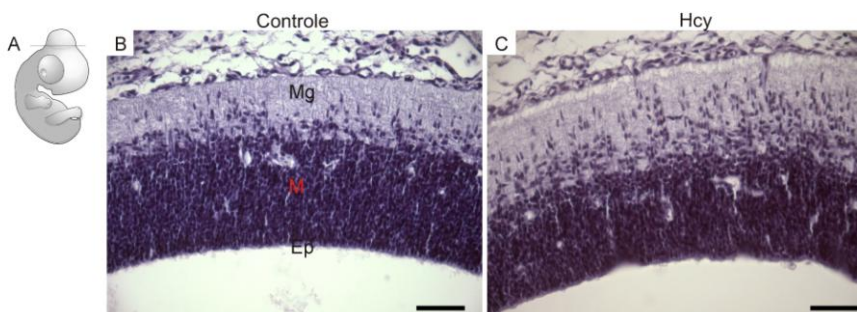


Figura 8: Cortes sagitais de mesencéfalo em embriões E6. (A) Esquema do corte sagital realizado no mesencéfalo (6 μm). Coloração hematoxilina – eosina. (B) Embrião controle; (C) Embrião tratado com Hcy. EP= epêndima, M= manto e Mg= marginal. Barras de escala = 25 μm

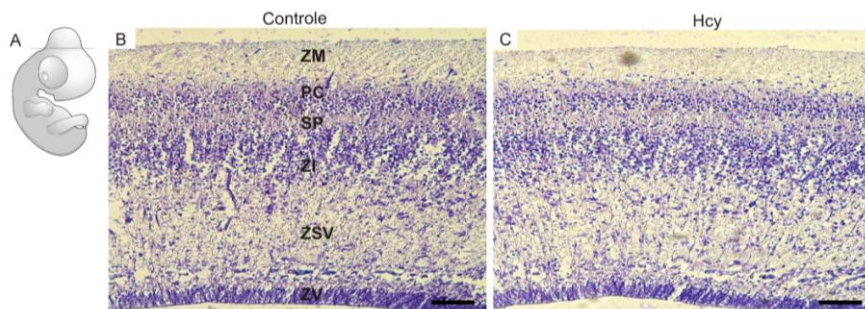


Figura 9: Cortes sagitais de mesencéfalo em embriões E10. (A) Esquema do corte sagital realizado no mesencéfalo (6 μm). Coloração hematoxilina – eosina. (B) Embrião controle; (C) Embrião tratado com Hcy. ZV= zona ventricular, ZSV= zona subventricular, ZI= zona intermediária, SP= subplaca, PC= placa cortical, ZM= zona do manto. Barras de escala = 100 μm .

4.2 Análise de Proliferação Celular

Células em divisão celular foram imunolocalizadas com anticorpo anti-fosfo-histona H3. Foi verificada a marcação positiva para esta proteína apenas na camada endimária. Nesta análise, a quantificação foi realizada pela densidade numérica de células por área (NA/mm^2). O grupo controle exibiu uma densidade de $59,13 \text{ mm}^2 (\pm 4,55)$, enquanto que os embriões tratados com Hcy apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na densidade para $45,25 \text{ mm}^2 (\pm 3,62)$ (Figura 10).

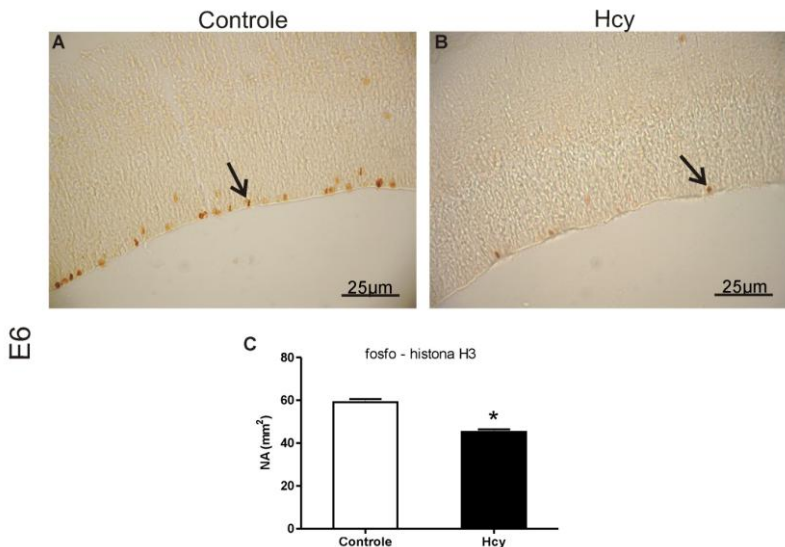


Figura 10: Imunomarcção utilizando o anticorpo anti-fosfo-histona H3 em embriões E6. Cortes sagitais de mesencéfalo (6 µm) de embriões de *G. domesticus*. (A) Embrião controle evidenciando grande densidade de células positivas distribuídas ao longo da camada ependimária. (B) Embrião tratado com Hcy. As setas pretas mostram as células marcadas com o anticorpo anti fosfo-histona H3. (C) Gráfico das quantificações de células imunorreativas. Barras representam a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p < 0,05$. $n = 5$ embriões.

Considerando os efeitos da Hcy sobre a proliferação celular, passou-se a investigar algumas das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, como p21, p53, PCNA e ciclina E. As quantificações destas proteínas foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo, e sua localização tecidual foi realizada por imuno-histoquímica com os anticorpos correspondentes.

A quantificação da proteína p21 no grupo tratado com Hcy mostrou-se significativamente menor ($p < 0,05$). Foram quantificadas 12,63 ($\pm 0,38$) células reativas, o que corresponde a aproximadamente a 0,13% do total de células analisadas, enquanto que o grupo controle exibiu o valor de 57,33 ($\pm 7,75$), que corresponde a cerca de 0,57%. A imunolocalização da proteína em questão foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica, a qual evidenciou células imunorreativas no grupo controle, na camada do manto e marginal (Figura 11).

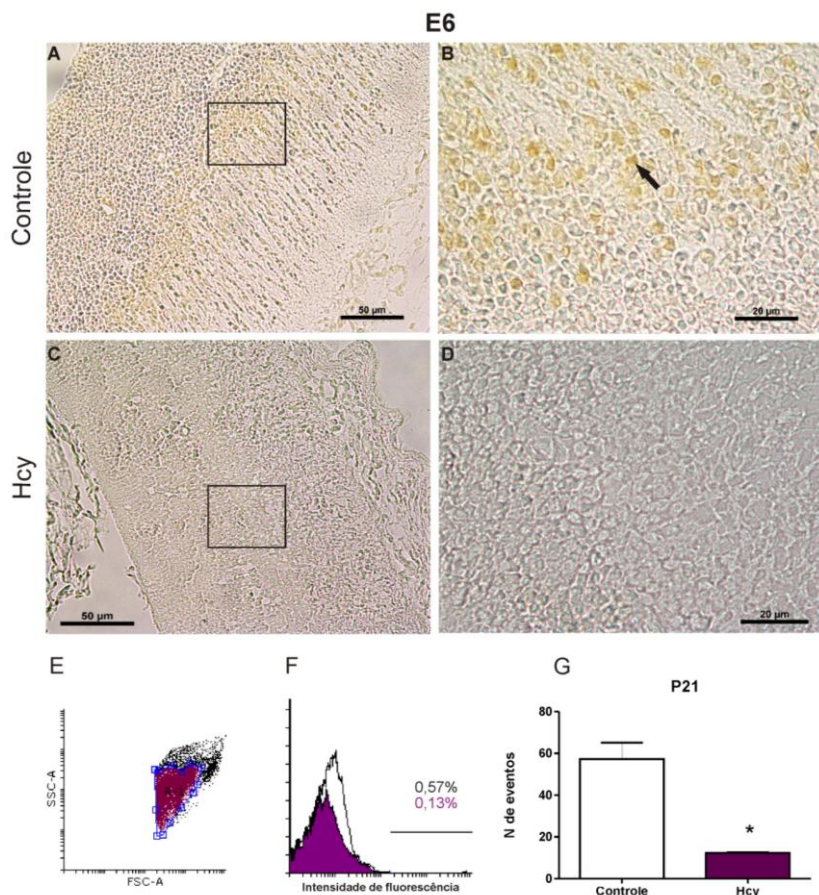


Figura 11: Imunolocalização e quantificação da proteína p21 por imunohistoquímica e citometria de fluxo. (A e C) vista panorâmica de cortes sagitais do mesencéfalo (6 μ m). (B e D) Detalhe da região demarcada (retângulo em A e C) destacando a célula imunomarcada (seta). (E) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (roxo). (F) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (G) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p < 0,05$. $n = 9$ (três encéfalos/grupo em três experimentos independentes).

Para a análise da proteína p53 foram quantificadas nos embriões do grupo controle 14,67 ($\pm 2,14$) células reativas a esta proteína, o que corresponde a 0,15% do total de células analisadas, sendo este valor significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com Hcy, onde quantificamos os valores de 75,67 ($\pm 9,34$) (0,76%). A imunolocalização desta proteína foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, a qual evidenciou células imunorreativas no grupo tratado com Hcy, na camada do manto e marginal (Figura 12).

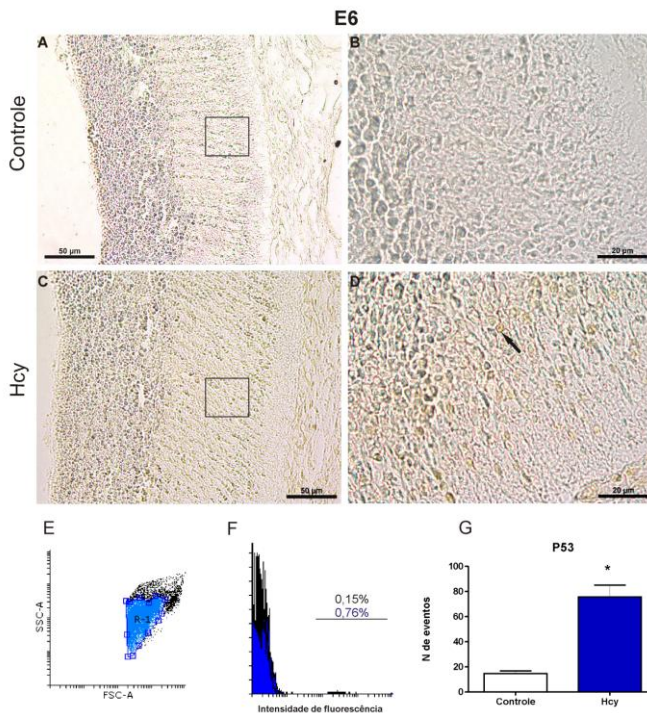


Figura 12: Imunolocalização e quantificação da proteína p53 por imunohistoquímica e citometria de fluxo. (A e C) vista panorâmica de cortes sagitais do mesencéfalo (6 μm). (B e D) Detalhe da região demarcada (retângulo em A e C) destacando a célula imunomarcada (seta). (E) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (azul). (F) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (G) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p < 0,05$. $n = 9$ (três encéfalos/grupo em três experimentos independentes).

Para a análise da proteína PCNA, as quantificações diferiram significativamente entre o grupo controle, onde foram quantificadas 35,25 ($\pm 9,45$) células reativas, o que corresponde a 0,35% do total de células analisadas, e o grupo tratado, que exibiu os valores de 12,25 ($\pm 1,65$) (0,12%) ($p < 0,05$). A imunolocalização da proteína em questão foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, a qual evidenciou imunorreatividade nos dois grupos na camada marginal (Figura 13).

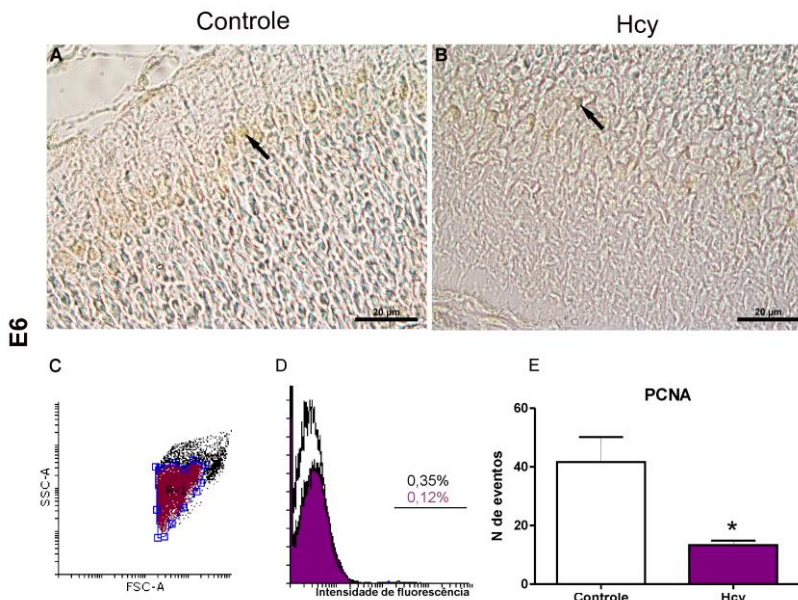


Figura 13: Imunolocalização e quantificação da proteína PCNA por imunohistoquímica e citometria de fluxo. (A e B) cortes sagitais do mesencéfalo (6µm), seta preta – perfil de marcação. (C) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (roxo). (D) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (E) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p < 0,05$. $n = 15$ (três encéfalos/grupo em cinco experimentos independentes).

A quantificação da proteína ciclina E no grupo tratado com Hcy mostrou-se significativamente menor ($p < 0,05$) sendo quantificadas 30,00 ($\pm 6,36$) células reativas (0,30%), quando comparada ao grupo

controle, que exibiu os valores de $115,33 (\pm 9,96)$ (1,15%). A imunolocalização da proteína em questão foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, a qual evidenciou imunorreatividade acentuada no grupo controle na transição da camada do manto para a camada marginal. (Figura 14).

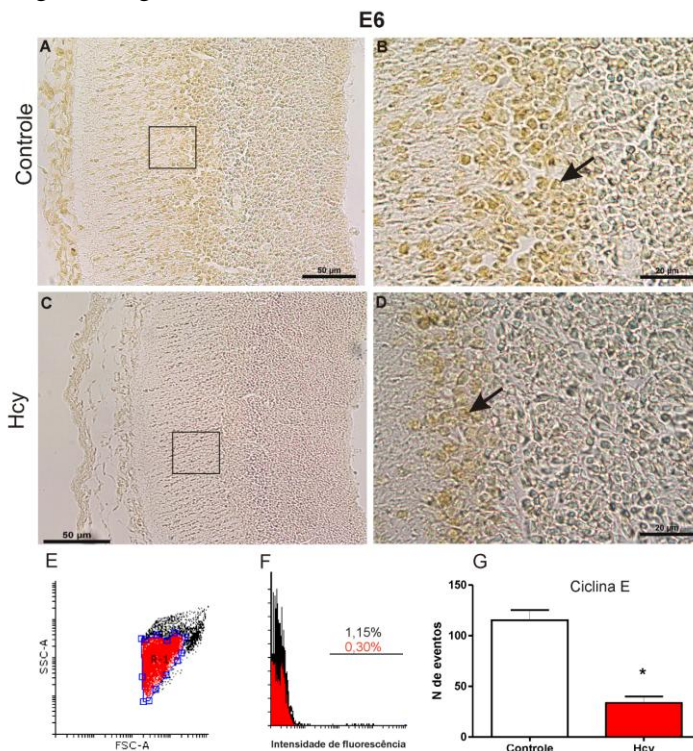


Figura 14: Imunolocalização e quantificação da proteína ciclina E por imunohistoquímica e citometria de fluxo. (A e C) vista panorâmica de cortes sagitais do mesencéfalo (6 μ m). (B e D) Detalhe da região demarcada (retângulo em A e C) destacando a célula imunomarcada (seta). (E) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (vermelho). (F) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (G) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p < 0,05$. $n = 9$ (três encéfalos/grupo em três experimentos independentes).

4.3 Análise de Diferenciação Neuronal

As quantificações para proteína β -tubulina III foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo, e sua localização realizada por imunohistoquímica em embriões em idade de E6. Já para os embriões em idade de E10, realizamos apenas as quantificações por citometria de fluxo (Figura 15 e 16).

Na idade de E6, as quantificações para a proteína β -tubulina III não diferiram significativamente entre os grupos controle, onde foram quantificadas 1.595,33 ($\pm 114,71$) células reativas, que corresponde a 15,95% do total de células analisadas, e o grupo tratado, que exibiu os valores de 1.899,33 ($\pm 186,84$) (19,00%) ($p > 0,05$). A imunolocalização da proteína realizada pela técnica de imunohistoquímica evidenciou imunorreatividade nos dois grupos experimentais, na camada do manto e marginal (Figura 15).

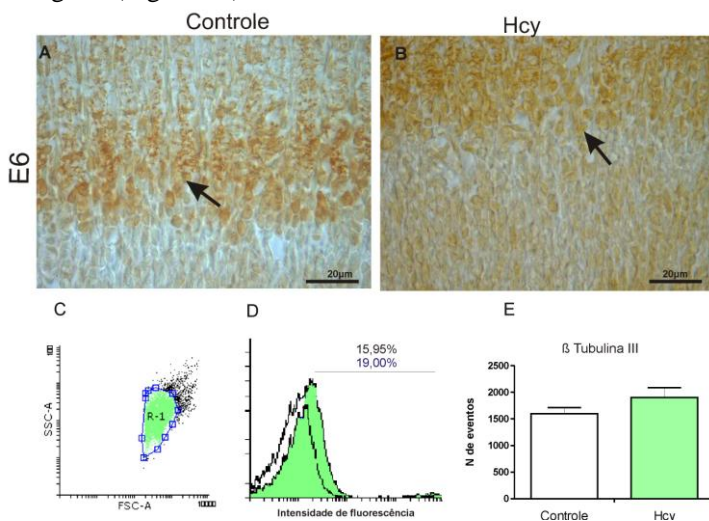


Figura 15: Imunolocalização e quantificação da proteína PCNA por imunohistoquímica e citometria de fluxo em embriões de idade de E6. (A e B) cortes sagitais do mesencéfalo (6µm), seta preta – perfil de marcação. (C) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A - Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (verde). (D) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (E) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. $n = 9$ (três encéfalos/grupo em três experimentos independentes).

Na idade de E10 o padrão de expressão da proteína neuronal manteve-se semelhante ao de E6. As marcações para β -tubulina III não revelaram diferenças significativas entre os embriões tratados com Hcy, onde quantificamos 1.495,00 (\pm 84,79) células reativas (14,95%) e os embriões do grupo controle, nos quais foram quantificadas 1.417,67 (\pm 6,05) células reativas (14,18%) ($p > 0,05$) (Figura 16).

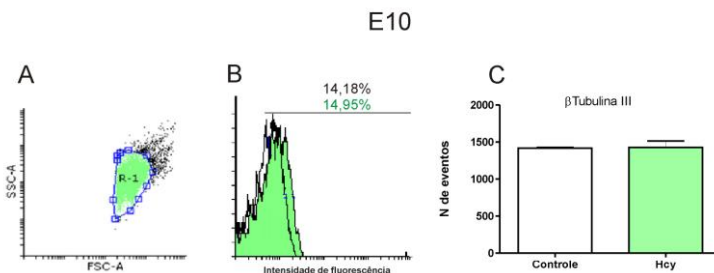


Figura 16: Quantificação da proteína β -tubulina III por citometria de fluxo em embriões de idade E10. (A) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (verde). (B) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (C) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. $n = 9$ (três encéfalos/grupo em três experimentos independentes).

4.4 Análise de Diferenciação Glial

Na idade de E6, as quantificações da proteína do citoesqueleto de astrócitos – GFAP foi realizada por citometria de fluxo. Os valores encontrados foram significativamente menores no grupo controle ($p < 0,05$) sendo quantificadas 44,00 (\pm 4,41) células reativas (0,44%), quando comparada ao grupo tratado com Hcy, que exibiu os valores de 113,00 (\pm 12,44%) (1,13%). A imunolocalização desta proteína foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, a qual evidenciou imunorreatividade nos dois grupos experimentais, porém com uma marcação mais acentuada no grupo tratado com Hcy, em todas as camadas celulares (Figura 17).

As marcações para proteína GFAP na idade de E10 não revelaram diferenças significativas entre os embriões tratados com Hcy, que apresentaram 4.761,00 (\pm 217,90) células reativas (47,61%) e os embriões do grupo controle, nos quais foram quantificadas 3.682,00 (\pm 86,52) células reativas (36,82%) ($p > 0,05$) (Figura 18).

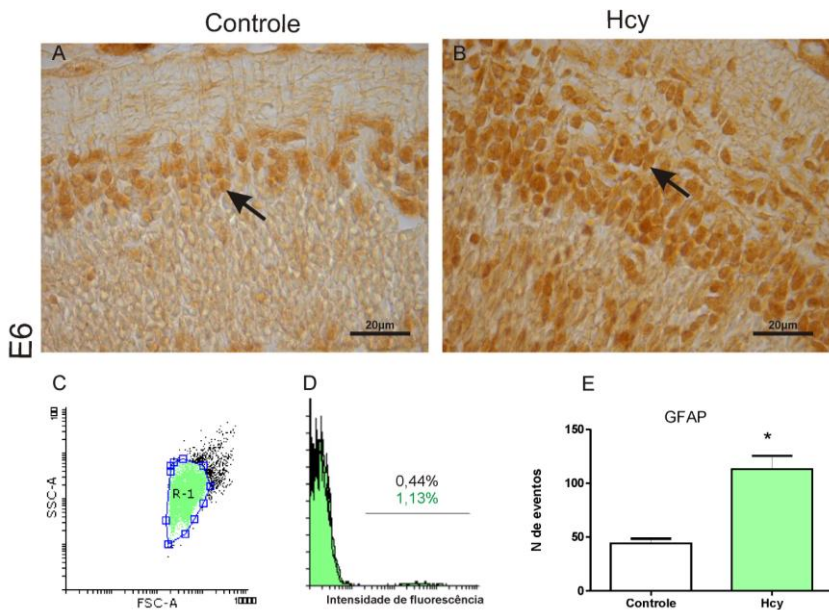


Figura 17: Imunolocalização e quantificação da proteína GFAP por imunohistoquímica e citometria de fluxo em embriões de idade E6. (A-B) cortes sagitais do mesencéfalo (6µm). Seta preta – perfil de marcação. (C) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células gliais analisadas (verde) (D). Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (E). Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p \leq 0,05$. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

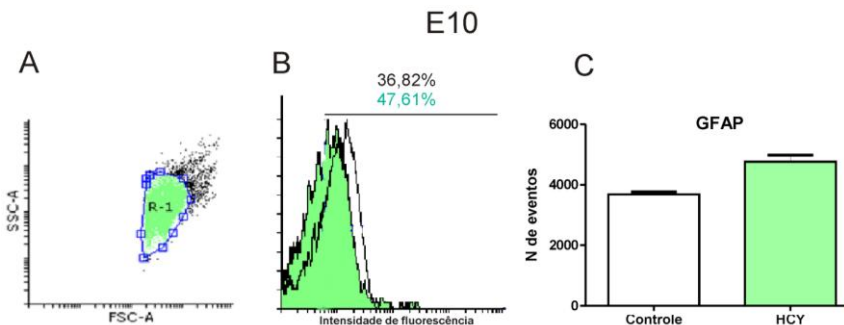


Figura 18: Quantificação da proteína GFAP por citometria de fluxo em embriões de idade E10. (A) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células gliais analisadas (verde). (B) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células marcadas (C). Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

4.5 Análise de Sobrevivência Neural

Nas quantificações para proteína BDNF nos embriões em E6, o grupo tratado com Hcy mostrou-se significativamente menor ($p < 0,05$) sendo quantificadas 1.846,33 ($\pm 40,13$) células reativas (18,46%), quando comparado ao grupo controle, que exibiu os valores de 3.032,00 ($\pm 65,77$) células reativas (30,32%). A localização tecidual de BDNF foi realizada pela técnica de imunohistoquímica que evidenciou marcações positivas na camada do manto (Figura 19).

Para idade de E10, as quantificações de proteína envolvida na sobrevivência neuronal não revelaram diferenças significativas entre os embriões tratados com Hcy, que apresentaram 3.998,00 ($\pm 244,04$) células reativas (39,98%) e os embriões do grupo controle, nos quais foram quantificadas 4.036,33 ($\pm 286,82$) células reativas (40,36%) ($p > 0,05$) (Figura 20).

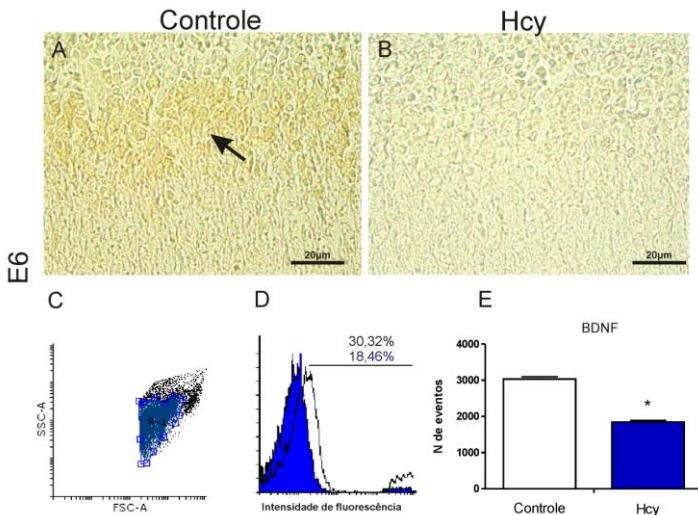


Figura 19: Imunolocalização e quantificação da proteína BDNF por imunohistoquímica e citometria de fluxo em embriões de idade E6. (A-B) cortes sagitais do mesencéfalo (6µm). Seta preta – perfil de marcação. (C) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (azul) (D). Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (E). Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p \leq 0,05$. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

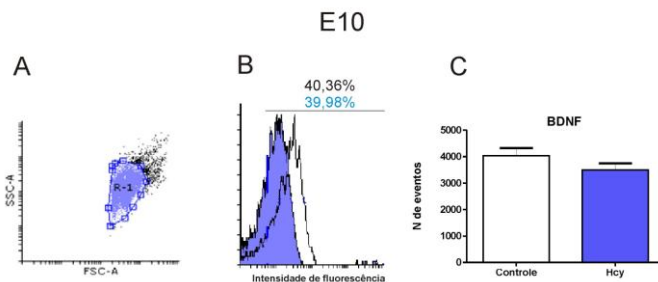


Figura 20: Quantificação da proteína BDNF por citometria de fluxo em embriões de idade E10. (A) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neuronais analisadas (azul). (B) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células marcadas (C). Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

A quantificação da proteína GDNF nos embriões em idade E6 mostrou uma redução significativa desta proteína nos embriões tratados com Hcy em E6, onde foram quantificadas 722,67(\pm 26,67) células reativas (7,23%) em comparação ao grupo controle, que exibiu os valores de 2.230,00 (\pm 71,57) células reativas (22,30%) ($p < 0,05$) (Figura 21).

Para os embriões na idade de E10 este valor se modificou. A quantificação de GDNF voltou aos níveis semelhantes aos do grupo controle, que exibiu os valores de 3.942,00 (\pm 205,87) células reativas (39,42%), já nos embriões expostos à Hcy foram quantificadas 3.339,00 (\pm 469,04) células reativas (33,39%) ($p > 0,05$) (Figura 22).

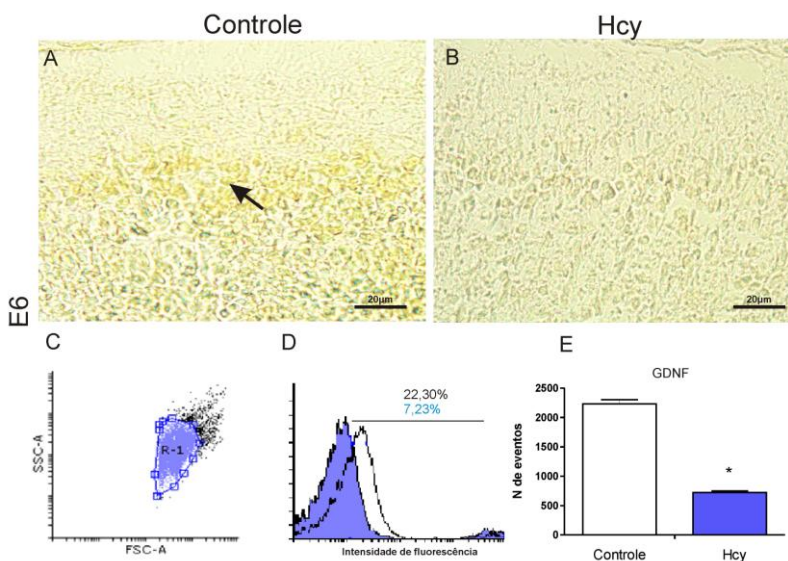


Figura 21: Quantificação e imunolocalização da proteína GDNF por citometria de fluxo e imunohistoquímica em embriões E6. (A-B) cortes sagitais do mesencéfalo (6 μ m), seta preta – perfil de marcação. (C) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (azul). (D) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (E) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. (*) indica diferença significativa com o grupo controle $p \leq 0,05$. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

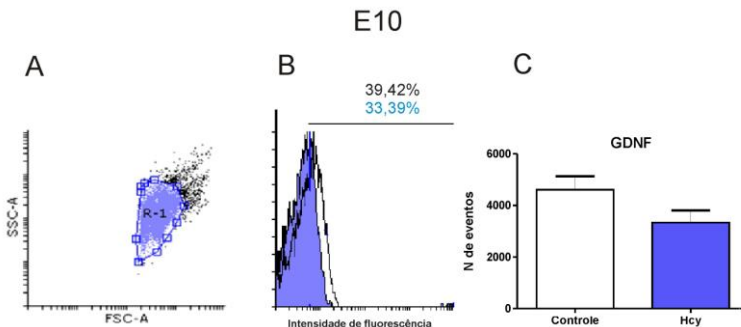


Figura 22: Quantificação da proteína GDNF por citometria de fluxo em embriões de idade E10. (A) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neuronais analisadas (azul). (B) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (C). Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

4.6 Análise de Apoptose

A partir dos resultados obtidos nas quantificações das proteínas do ciclo celular, os quais demonstraram a diminuição da proliferação celular e arresto no ciclo, procedeu-se as quantificações por citometria de fluxo para proteínas envolvidas no processo de apoptose, como BCL2 e BAK em embriões nas idades de E6 e E10 (Figura 23 e 24).

Em embriões de idade E6 as quantificações da proteína anti-apoptótica BCL2 não revelaram diferenças significativas entre o grupo controle, onde foram quantificadas 6.304,00 ($\pm 83,53$) células reativas (63,04%) e o grupo tratado, que exibiu os valores de 6.723,00 ($\pm 115,21$) células reativas (67,23%) ($p > 0,05$). Igualmente, as quantificações para proteína pró-apoptótica BAK também não demonstraram diferença significativa do grupo controle 32,67 ($\pm 2,14$) (0,33%) e o grupo tratado 24,33 ($\pm 1,02$) (0,24%) ($p > 0,05$) (Figura 23).

Para os embriões em idade de E10, esse mesmo padrão foi mantido. As quantificações para a proteína anti-apoptótica BCL2 não diferiram significativamente entre os embriões tratados com Hcy, sendo quantificadas 219,00 ($\pm 21,20$) células reativas (2,19%) e os embriões do grupo controle, nos quais foram quantificadas 197,00 ($\pm 24,08$) células reativas (1,97%) ($p > 0,05$). Do mesmo modo, as quantificações

para a proteína pró-apoptótica BAK não revelaram diferenças significativas entre os embriões tratados com Hcy, que apresentaram 23,33 ($\pm 0,51$) células reativas (0,23%) e os embriões do grupo controle, nos quais foram quantificadas 17,00 ($\pm 0,88$) células reativas (0,17%) ($p > 0,05$) (Figura 24).

E6

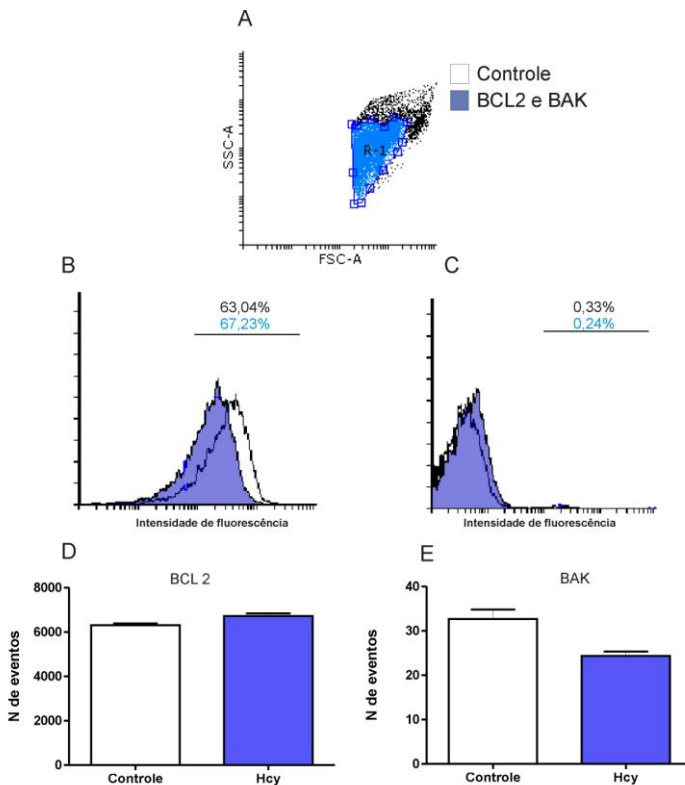


Figura 23: Quantificação da expressão das proteínas BCL2 e BAK por citometria de fluxo em embriões E6. (A) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (azul). (B e C) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (D e E) Gráficos de barras representando a média \pm erro padrão do número células marcadas. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

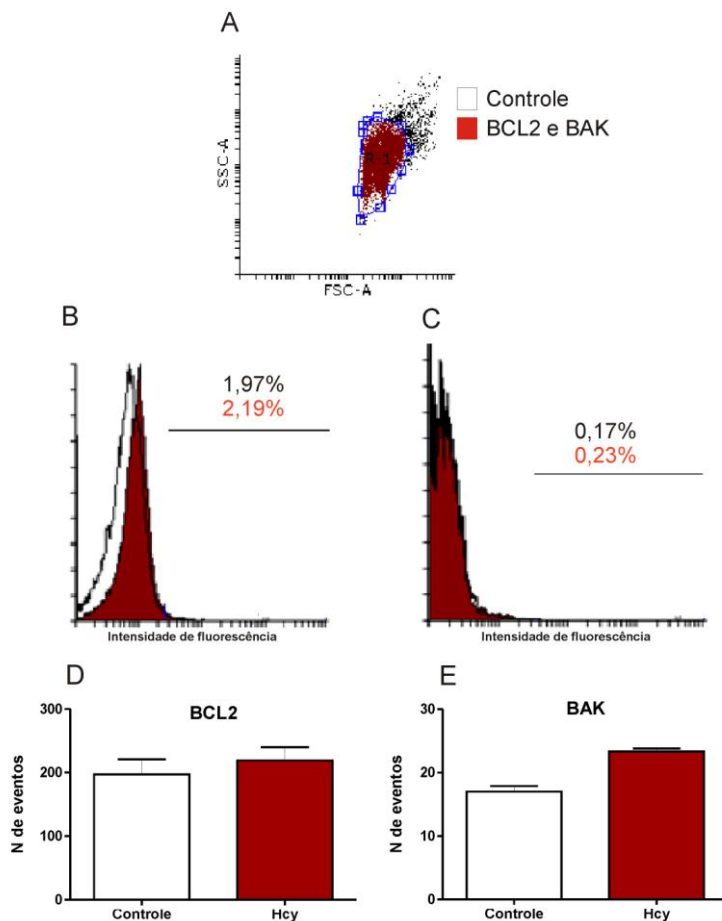


Figura 24: Quantificação da expressão das proteínas BCL2 e BAK por citometria de fluxo em embriões E10. (A) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (vermelho). (B e C) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (D e E) Gráficos de barras representando a média \pm erro padrão do número células marcadas. $n = 3$ encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

4.7 Análises Ultraestruturais do Mesencéfalo de *G. domesticus*

Na análise ultraestrutural dos mesencéfalos foi possível identificar na idade embrionária de E6, em ambos os grupos experimentais as três camadas celulares – camada ependimária, manto e marginal. Porém, durante essas análises não conseguimos diferenciar com segurança os neurônios das células gliais. Foram identificadas apenas as células ependimárias, as quais diferenciamos das demais células neurais, e os prolongamentos axonais presentes na camada marginal (Figuras 25,26,27 e 28).

4.7.1 Epêndima

As células do epêndima são células que delimitam os ventrículos cerebrais. Estas células se mantêm em um arranjo epitelial com pouco espaço extracelular. Possuem forma arredondada, com núcleo volumoso, cromatina evidente e bastante eletrondensa. Há pouco citoplasma e organelas escassas. Essas características aqui citadas são bastante proeminentes no grupo controle (Figura 24 A e C) . Animais tratados com Hcy apresentaram citoplasma menos eletrondenso, alterações na integridade da membrana plasmática e dilatação no espaço perinuclear (Figura 25 B e D).

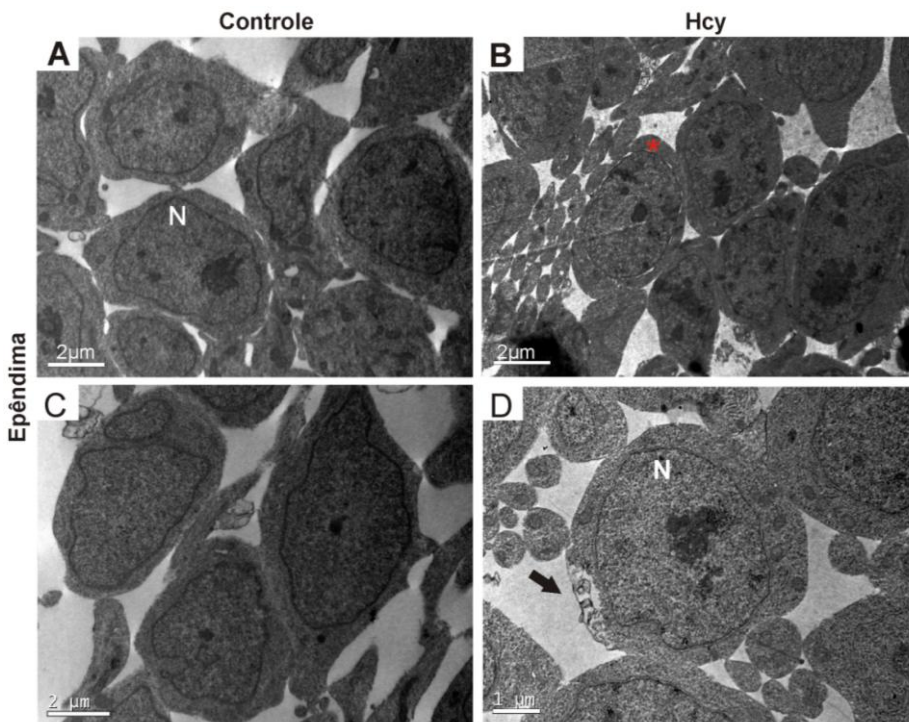


Figura 25: Eletromicrografia da camada do epêndima no mesencéfalo de embrião de *G. domesticus* (E6). (A e C) Células do epêndima de embrião controle. Nota-se o formato arredondado e núcleo volumoso. (B e D) embrião pertencente ao grupo Hcy, com alterações na membrana perinuclear e membrana citoplasmática. N, núcleo; asterisco vermelho, espaço perinuclear dilatado. Seta preta, alteração na integridade da membrana plasmática.

4.7.2 Camada do Manto

A camada do manto foi reconhecida na secção ultrafina devido a grande densidade de corpos celulares das células neurais e prolongamentos escassos. Como visualizado, as células presentes nesta camada possuem um grande núcleo central com cromatina evidente e pouco citoplasma no seu entorno. Nota-se também a presença de poucas organelas distribuídas no citoplasma e presença de algumas mitocôndrias (Figura 26 e 27).

As alterações ultraestruturais mais evidentes são observadas no citoplasma das células do grupo tratado com Hcy. Nestas células notamos a presença de várias estruturas de aspecto vesicular com membranas no seu interior, perda da integridade citoplasmática e redução da eletrondensidade citoplasmática. O espaço perinuclear nestas células expostas à Hcy mostra-se constantemente dilatado (Figura 26 e 27).

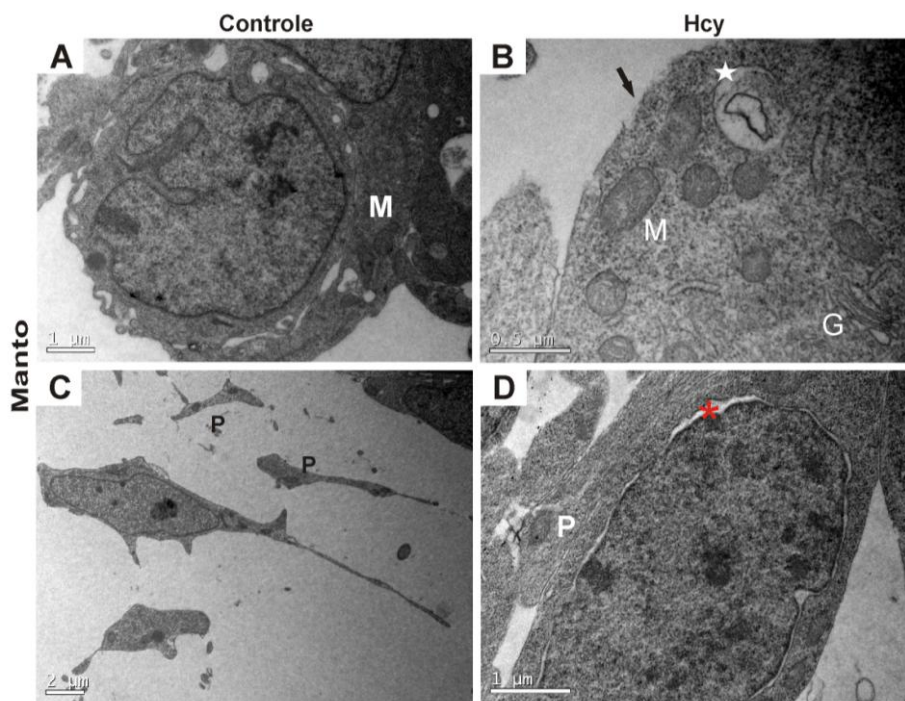


Figura 26: Eletromicrografia da camada do manto no mesencéfalo de embrião de *G. domesticus* (E6). (A) Célula neural arredondada com núcleo volumoso em embrião controle. (C) célula neural com formato alongado e delgado prolongamento celular – grupo controle. (B e D) embriões pertencentes ao grupo Hcy com alterações citoplasmáticas e nucleares. M, mitocôndria; P, prolongamento de outras células; G, corpos de Golgi; estrela branca, estrutura vesicular com membrana no seu interior; Seta preta, alteração na membrana plasmática; Asterisco vermelho, espaço perinuclear dilatado. n= 3 embriões por grupo.

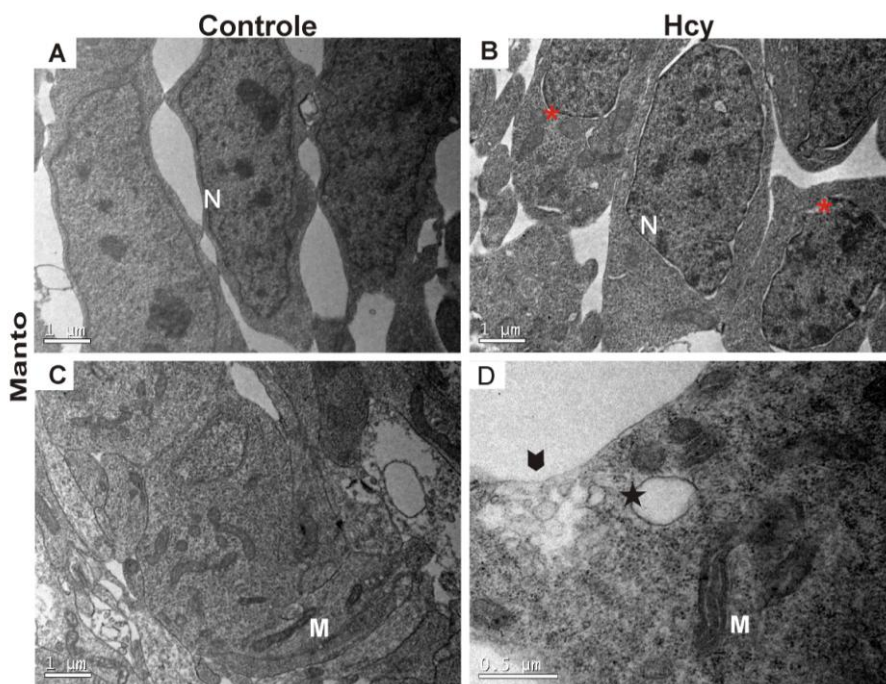


Figura 27: Eletromicrografia da camada do manto no mesencéfalo de embrião de *G. domesticus* (E6). (A e C) embrião controle. (B e D) embrião pertencente ao grupo Hcy, com alterações no espaço perinuclear e no citoplasma. N, núcleo; M, mitocôndria; asterisco vermelho, membrana perinuclear alterada; estrela, estrutura vesicular; cabeça de seta, alteração na membrana plasmática. n= 3 embriões por grupo.

4.7.3 Camada Marginal

A camada marginal, a mais externa durante o desenvolvimento do mesencéfalo, é constituída pelos prolongamentos axonais, que são grandes extensões celulares que emergem dos neurônios presentes na camada do manto. Nas secções ultrafinas percebemos a grande variedade destes, evidenciados em diferentes planos de corte, transversal e longitudinal, além do pouco espaço extracelular, mostrando um íntimo contato dessas estruturas.

A presença de várias mitocôndrias nestas estruturas é relacionada principalmente à liberação de neurotransmissores. No plano de corte longitudinal, os prolongamentos axonais são visualmente identificados como estruturas alongadas delimitadas por membranas. Já transversalmente, os prolongamentos axonais destacam-se como estruturas pequenas e arredondadas. Nota-se também o perfil mitocondrial eletrondenso destas estruturas. Alterações ultraestruturais mais evidentes nestas estruturas foram a perda da eletrondensidade citoplasmática dos prolongamentos celulares e a formação anômala de membranas (Figura 28).

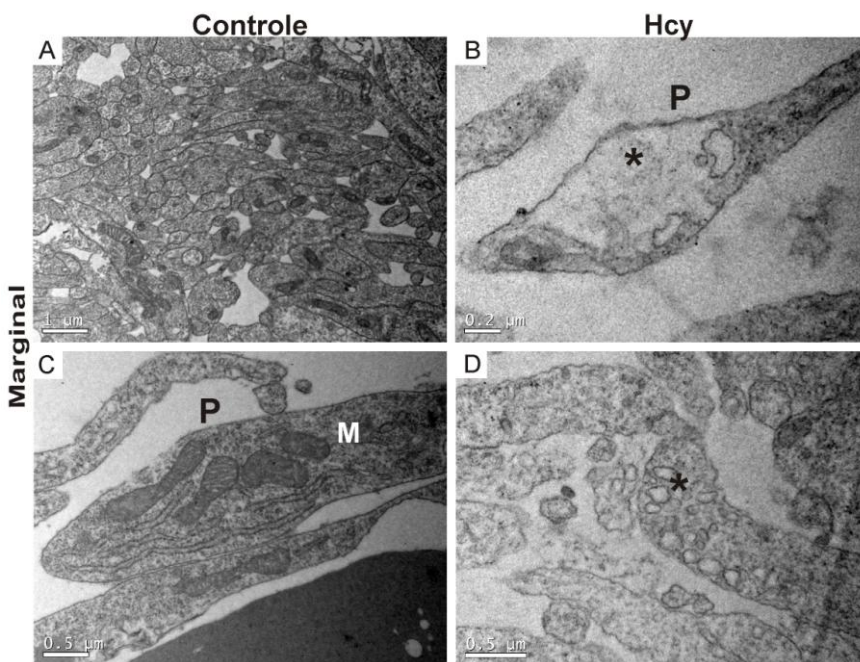


Figura 28: Eletromicrografia da camada marginal no mesencéfalo de embrião de *G. domesticus* (E6). (A e C) Observam-se os prolongamentos delimitados por membranas e o perfil mitocondrial eletrondenso nos embriões controle. (B e D) Nota-se a perda da eletrondensidade citoplasmática, além das formações anômalas de membrana nos embriões tratados com Hcy. P, prolongamento axonal; M, mitocôndria; asterisco preto, citoplasma alterado com presença de estruturas vesiculares internamente; n= 3 embriões por grupo.

4.7.4 Análise Ultraestrutural em Embriões E10

Para os embriões em idade de E10, a análise ultraestrutural foi realizada apenas na camada mais adjacente à camada ventricular, devido a facilidade de identificação da mesma. Como resultado, encontramos o mesmo padrão de alterações verificado na idade de E6, com predominância das alterações no espaço perinuclear, alterações celulares de aspecto vesicular e perda da eletrondensidade (Figura 29).

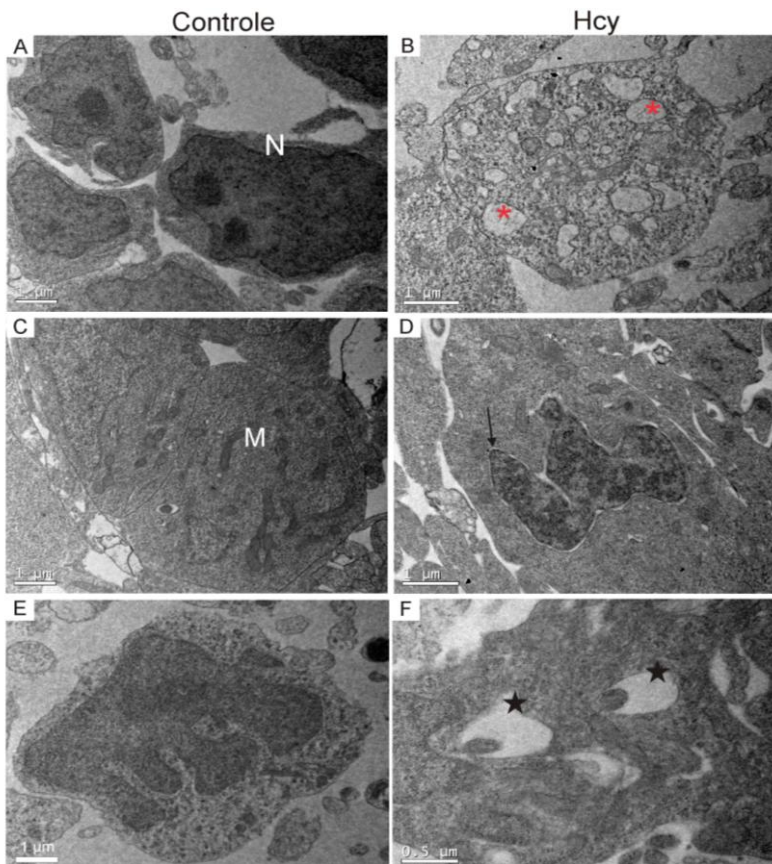


Figura 29: Eletromicrografia do mesencéfalo de embrião de *G. domesticus* em idade E10. **(B, D e F)** Observa-se a perda da eletrondensidade citoplasmática, além das formações anômalas de membrana e dilatação do espaço perinuclear nos embriões tratados com Hcy. N, núcleo; M, mitocôndria; asterisco vermelho, estruturas com aspecto vesicular; seta preta, dilatação do espaço perinuclear; estrela, alterações citoplasmáticas; n= 3 embriões por grupo.

4.8 Análise para Autofagia

A partir das observações obtidas na análise ultraestrutural das células neurais, procedeu-se às marcações para autofagia. Esta análise teve a finalidade de confirmar se as vesículas encontradas nas células dos embriões do grupo tratado com Hcy seriam vacúolos autofágicos. Para tal, utilizamos o corante fluorescente acidotrópico Laranja de Acridina, o qual reage com compartimentos celulares ácidos. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo, e sua localização tecidual por citoquímica.

Para idade embrionária de E6 não encontramos diferenças significativas entre os dois grupos experimentais, onde embriões controle apresentaram 7.947 ($\pm 62,40$) células reativas ao corante, o que corresponde a 79,47% num total de 10.000 células analisadas. Já o grupo tratado com Hcy apresentou 8.037,00 ($\pm 56,90$) células reativas ao corante, que corresponde a 80,37% do total de células analisadas ($p > 0,05$) (Figura 30)

Para as quantificações na idade de E10 o mesmo padrão foi mantido. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos, onde os embriões controle exibiram os valores de 19.100,00 ($\pm 117,87$) células reativas ao corante, o que corresponde a 95,5% num total de 20.000 células analisadas. Já os embriões do grupo Hcy apresentaram os valores de 19.448,00 ($\pm 185,82$) células reativas (97,5%) ($p > 0,05$) (Figura 31).

Na análise por citoquímica para este corante foi possível observar uma marcação inespecífica em todo o tecido nos dois grupos experimentais e nas duas idades, o que dificultou a interpretação dos resultados. A alta densidade celular das camadas celulares do mesencéfalo também mostrou-se um fator limitante para a confirmação da marcação (Figura 30 e 31).

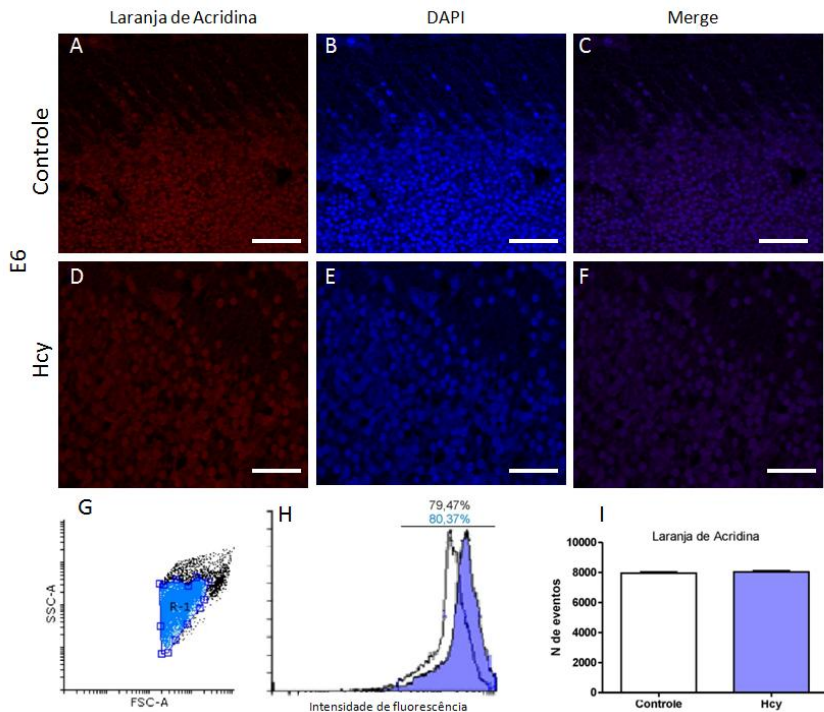


Figura 30: Quantificação e localização de compartimentos autofágicos por citoquímica e citometria de fluxo em embriões E6. (A-F) cortes sagitais do mesencéfalo (6μm), corados por laranja de acridina.(B -E) núcleos corados com DAPI. (C-F) sobreposição do marcador laranja de acridina com DAPI. (G) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (azul). (H) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células reativas. (i) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. Barras de escala em A,B,C= 50 μm, e em D,E,F= 25μm. n = 3 encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

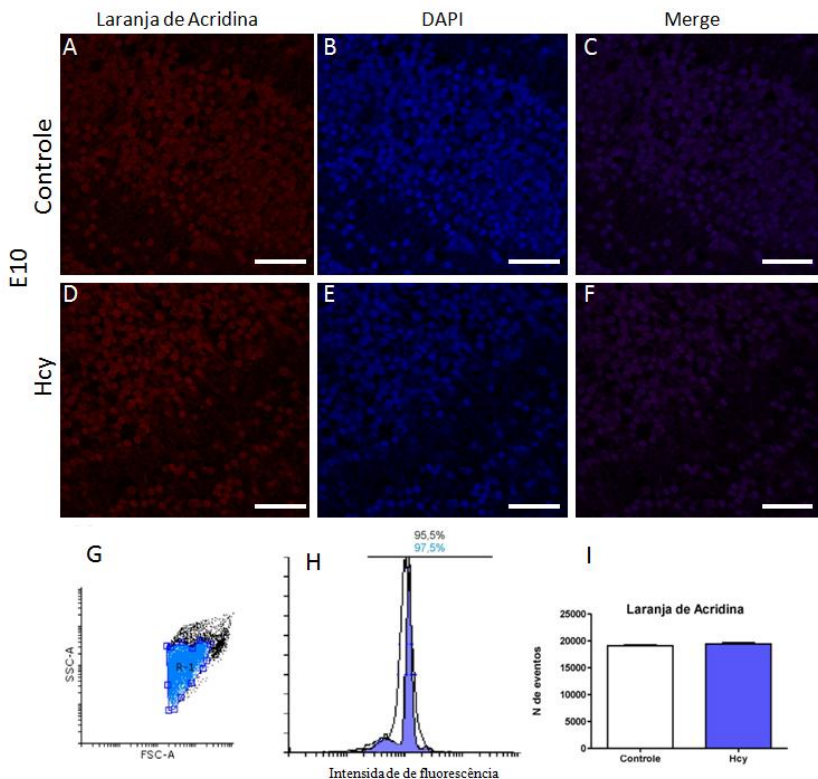


Figura 31: Quantificação e localização de compartimentos autofágicos por citotóxicidade e citometria de fluxo em embriões E10. (A-F) cortes sagitais do mesencéfalo (6µm), corados por laranja de acridina.(B -E) núcleos corados com DAPI. (C-F) sobreposição do marcador laranja de acridina com DAPI. (G) Dot Plot (Tamanho (X) – do inglês *FSC-A* - *Forward Scatter* / Complexidade (Y) – do inglês *Side scatter*) demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células neurais analisadas (azul). (H) Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células reativas. (i) Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de células marcadas. Barras de escala: 25 µm. n = 3 encéfalos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

Em síntese, nossos resultados demonstram que a dose de Hcy administrada interferiu na dinâmica celular do tecido neural através do aumento da expressão de p53, diminuição de p21 e ciclina-E. Além disso, aumentou a expressão de GFAP nos embriões em idade de E6 e mas não nos embriões em E10. Adicionalmente a Hcy diminuiu a expressão das proteínas responsáveis pela sobrevivência neuronal (BDNF) e glial (GDNF) nos embriões em E6, porém este mesmo padrão não foi encontrado na idade de E10. Por fim, a análise por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que as ultraestruturas alvo da Hcy neste estudo são o núcleo, citoplasma e membrana (Quadro 3).

Quadro3: Interferência de elevados níveis de Hcy na expressão de proteínas do ciclo celular, diferenciação neural, sobrevivência neural e marcação para autofagia.

Tratamento	Fosfo histona	P53	P21	Ciclina E	PCNA	BCL2	BAK	β-Tubulina	GFAP	BDNF	GDNF	L. Acridina
Hcy – E6	↓	↑	↓	↓	↓	S/A	S/A	S/A	↑	↓	↓	S/A
Hcy – E10	-	-	-	-	-	S/A	S/A	S/A	*↓	*↑	*↑	S/A

↑ Aumento expressivo; ↓ diminuição expressiva; S/A – sem alteração.
* em relação à idade de E6.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou avaliar como os elevados níveis de Hcy afetam a dinâmica celular do sistema nervoso central durante o desenvolvimento de *Gallus domesticus*. Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram conduzidas para demonstrar a influência das altas concentrações de Hcy, principalmente durante o desenvolvimento. Nestes estudos experimentais, a Hcy administrada provocou efeitos variados nas espécies estudadas e demonstrou exercer seu efeito dependente da dose e do período de exposição (van Aerts et al. 1993; Maestro de las Casas et al. 2003; Latacha & Rosenquist 2005; van Mil et al. 2010).

Estudos sobre os efeitos embriotóxicos da Hcy utilizando embriões de galinha como modelo experimental tornam-se vantajosos pelas seguintes características; os embriões se desenvolvem na ausência da influência materna, não é necessária técnica operatória para a obtenção dos embriões, além da aplicação da substância de interesse ser tecnicamente simples (*in ovo*). Além disto, o completo sequenciamento gênico de *G. domesticus* viabiliza a condução de pesquisas no âmbito molecular (Boardman et al. 2002). Neste sentido, o modelo biológico experimental utilizado nesta pesquisa parece ser um bom modelo para estudos onde podemos simular uma condição de hiperhomocisteinemia.

Pesquisas sobre o potencial neurotóxico da Hcy e do seu envolvimento com a ocorrência de anomalias do SNC, além de danos celulares reconhecidos principalmente *in vitro* tem sido amplamente relatadas na literatura (van Aerts et al. 1993; Sachdev 2005; Oldreive & Doherty 2007; Zou et al. 2010). Embora estas relações sejam continuamente reportadas, no presente estudo, todos os embriões analisados exibiram morfologia externa normal para as idades embrionárias analisadas (E6 e E10). Logo, os dados aqui discutidos nos trazem informações principalmente sobre a interferência da Hcy sobre os mecanismos celulares de proliferação, diferenciação e sobrevivência neural.

Avaliamos primeiramente o mecanismo de proliferação celular nos embriões em idade E6. O anticorpo anti-fosfo-histona H3 foi empregado como marcador celular de proliferação, pois a proteína histona H3 fosforilada é necessária ao processo de condensação da cromatina durante o mecanismo de divisão celular (Polo & Almouzni 2005). A análise celular demonstrou marcação positiva para esta proteína nos dois grupos experimentais, especificamente na camada endodérmica, o que era esperado, uma vez que nesta camada estão

localizadas as células precursoras dos neurônios e das células da glia. Tais células estão em constante divisão celular; e cada precursor conclui rapidamente as etapas do ciclo celular e origina células-filhas que ou recomeçam o ciclo ou migram para formar as camadas sucessivas à ependimária (Hollyday 2001; Lent 2005). Contudo, nossos resultados apontam para uma diminuição significativa da proliferação celular no grupo exposto à Hcy. Esta diminuição pode estar relacionada ao fato da Hcy alterar os mecanismos de modificação pós-traducionais das histonas, os quais são necessários para a metilação da sua região N-terminal. Esta reação de metilação é possível devido a transferência dos grupamentos metil gerados através do metabolismo da Hcy. Dessa forma, as modificações de histonas podem atuar na regulação da expressão gênica, controle da replicação celular e reparo do DNA (Waterland 2006; Bhaumik et al. 2007; Xu et al. 2015).

O preciso controle do ciclo celular durante o mecanismo de proliferação possibilita a fiel replicação de cada célula, a formação e o desenvolvimento de um tecido nervoso funcional. Alterações neste processo podem estar relacionadas a algum tipo de estresse celular, incluindo dano ao DNA, onde a quebra da homeostase do tecido pode ativar a proteína p53 (Schwartz & U 1998; Brady & Attardi 2010). Em nossa análise da quantificação das proteínas envolvidas no ciclo celular, a administração de 20 μ mol de Hcy foi capaz de induzir a superexpressão da proteína p53 no grupo dos animais tratados, na idade de E6. Em células saudáveis, esta proteína encontra-se em baixos níveis, entretanto, em resposta a determinado fator, a p53 é ativada, tem seu nível aumentado e passa a atuar como fator de transcrição para determinados produtos gênicos, promovendo a interrupção do ciclo celular para concomitante reparo ou apoptose (Zhang & Xiong 2001; Pietsenpol & Stewart 2002). Este mesmo padrão de aumento na atividade de p53 foi encontrado por Kruman et al. (2000) em células neuronais no hipocampo de roedores. Nestas condições, danos ao DNA podem ser resultado da não remetilação ou hipometilação da Hcy em metionina, que afeta diretamente o mecanismo de metilação do DNA. Assim, os grupamentos metil necessários para as reações de metilação do DNA não são gerados (Zhou et al. 2014; Bourckhardt et al. 2015).

Nossos resultados apontam para uma diminuição da proteína p21 e ciclina-E nos embriões tratados com Hcy. Em resposta a ativação de p53, as proteínas p21 e PCNA são recrutadas para exercer o controle do ciclo celular durante a sua progressão e transição da fase G1 para S. Desta forma estas proteínas bloqueiam a transição da célula alterada para a próxima fase do ciclo, impedindo o início da replicação do DNA

alterado (Pietenpol & Stewart 2002). Este controle da transição do ciclo executado via p21 e PCNA, é mediado através da inibição das ciclinas dependente de cinases (Cdk's). A Ciclina-E especificamente, é igualmente necessária para a transição da célula na fase G1 para S ao se ligar ao seu complexo enzimático Cdk correspondente (ciclinaE/Cdk2) que é inativado por p21 (Martínez-Carpio & Navarro Moreno 2003). Desta forma, a diminuição da expressão destas duas proteínas nos leva a crer que os efeitos do tratamento com Hcy não foram capazes de bloquear a progressão das células alteradas durante a replicação celular, nem ativar seu reparo.

Em conjunto, o aumento da proteína p53 e a diminuição das proteínas p21, ciclina-E e fosfo-histona H3 podem nos indicar que o mecanismo de morte celular programada por apoptose esteja sendo requerido. Para tal, as quantificações das proteínas anti-apoptótica - Bcl2 e pró-apoptótica - Bak foram realizadas nas idades de E6 e E10. Estas duas proteínas participam ativamente dos mecanismos de regulação da via intrínseca da apoptose. Em situações de homeostasia celular, a expressão destas proteínas é mantida em equilíbrio, contudo, possíveis alterações neste processo podem induzir a um desequilíbrio que potencialmente ativa o processo de apoptose (Pietenpol & Stewart 2002). A via intrínseca portanto, está relacionada a alterações celulares, como, por exemplo, dano ao DNA, que convergem principalmente para a participação mitocondrial, culminando com a liberação de proteínas pró-apoptóticas por esta organela (Brady & Attardi 2010). Nossos resultados demonstram que nenhuma das proteínas de ativação à apoptose investigadas teve sua expressão alterada. Contudo, a investigação de proteínas que atuem nas outras vias apoptóticas ou em outro tipo de morte celular podem esclarecer estes eventos.

Elevados níveis de Hcy induzem diferentes alterações, como o estresse oxidativo e danos ao DNA, que desencadeiam a apoptose no sistema nervoso (ZHU et al., 2003; AFMAN et al., 2005; SACHDEV, 2005). O estudo de Lipton *et al.* (1997), demonstra que a apoptose induzida por elevados níveis de Hcy pode ocorrer pela estimulação do receptor *N-metil D-aspartato* (NMDA) e consequente liberação e aumento de $[Ca^{2+}]$ citoplasmáticos. Além disso, Bottiglieri (2005) demonstra que a Hcy pode induzir danos celulares, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que provocam estresse oxidativo, que por sua vez, pode levar a apoptose. Apesar dos dados da literatura sugerirem uma forte ligação entre elevados índices de Hcy e apoptose no SNC, nossos dados sugerem que a dose de 20mol não ativa

a apoptose mediante as proteínas aqui estudadas. Para comprovação deste mecanismo, novas vias devem ser investigadas.

Durante o desenvolvimento do tecido nervoso, a aquisição do fenótipo neuronal é garantida pela expressão da proteína tubulina. Esta proteína pertence a um grupo de proteínas do citoesqueleto que proporciona aos neurônios mobilidade, principalmente durante o período de migração, manutenção da morfologia e motilidade das suas organelas internas. A β -tubulina corresponde a um dos oito isótopos desta proteína identificado em mamíferos e aves. Dentre estes, o subtipo III, é predominantemente encontrado no cérebro, sendo amplamente utilizado como marcador para neurônios maduros (Brady et al. 2014)

Durante nosso estudo, a diferenciação neuronal foi analisada por meio da utilização do anticorpo anti- β -tubulina III pela combinação das técnicas de citometria de fluxo e imuno-histoquímica. Como resultado, encontramos que a Hcy não interfere na expressão desta proteína nas idades de E6 e E10. Adicionalmente, a imunolocalização desta proteína ressaltou sua marcação positiva em todos os tratamentos, com predominância de marcação na camada do manto e marginal, mas nunca na camada endimária. Estudos realizados em ratos forneceram subsídios para estabelecer este padrão de distribuição dos neurônios nas respectivas camadas. Em estudos clássicos de proliferação celular, através de marcações com timidina-H3 foi possível estabelecer a gênese dos neurônios conforme o padrão mencionado anteriormente. Os neuroblastos presentes no neuroepitélio dão origem a neurônios que diferenciam e migram para formar a camada do manto, e posteriormente a camada marginal (Sidman et al. 1959; Sidman & Rakic 1973). Assim as marcações para o fenótipo neuronal, aparecem somente após a diferenciação dos neuroblastos em neurônios, e isto é evidenciado nas camadas do manto e marginal. Estudo conduzido por Loureiro et al. (2010) utilizando diferentes concentrações de Hcy corroboram com nossos resultados. Esses autores avaliaram através de imuno-histoquímica a influência das concentrações de 10, 100 e 500 μ M de Hcy sobre o remodelamento do citoesqueleto de neurônios e astrócitos. No entanto, nenhuma das três concentrações testadas foi capaz de produzir efeitos sobre a β -tubulina III dos neurônios em cultura. Em contrapartida, o efeito de Hcy sobre os neurônios parece ser principalmente através da estimulação do receptor NMDA, que induz estresse oxidativo, formação de radicais livres, ativação de óxido nítrico sintase, levando a morte celular (Poddar & Paul 2009). Assim, a utilização da concentração de 20 μ mol de Hcy utilizada em nossos

experimentos não afeta a dinâmica das proteínas do citoesqueleto em neurônios diferenciados nas duas idades analisadas.

Diferentemente da sua ação sobre os neurônios, a Hcy parece atuar de forma mais danosa aos astrócitos. A análise da diferenciação destas células foi realizada utilizando anticorpo anti-GFAP como marcador. Em ambos os tratamentos foi evidenciada a marcação positiva para GFAP. Este resultado já era esperado, visto que a proteína fibrilar ácida é a principal proteína dos filamentos intermediários de astrócitos maduros presentes no SNC (Eng et al. 2000). Os astrócitos atuam como suporte neuronal e desempenham papéis importantes na manutenção da função do cérebro (Laming et al. 2000). Além dos astrócitos, foi demonstrado em primatas que as células da glia radial originadas do neuroepitélio também expressam GFAP (Campbell & Götz 2002).

Em nossas análises para idade de E6, tanto por citometria de fluxo, quanto por imuno-histoquímica, os embriões expostos à Hcy mostraram uma elevada reatividade a esse marcador, ou seja, o tratamento com Hcy aumentou a expressão de GFAP nas células gliais. Além da predominância das marcações, as células GFAP+ encontram-se presentes nas três camadas do mesencéfalo destes embriões, inclusive na camada mais indiferenciada – a camada endimária. Os astrócitos são capazes de responder a danos causados ao SNC em resposta a substâncias tóxicas, através da proliferação, hipertrofia do corpo celular e dos processos astrocitários e aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto, principalmente GFAP. Esta condição específica é conhecida como gliose reativa (astrogliose) (Pitanga et al. 2012; Burda & Sofroniew 2014), e é requerida como uma resposta celular para restauração do tecido afetado através da formação de uma cicatriz glial, onde a produção de fatores neurotróficos e citocinas auxiliam na sobrevivência neural (Silver & Miller 2004). Este tipo de resposta pode variar em intensidade, dependendo do dano causado. Na gliose moderada, há um perceptível aumento na expressão de GFAP. A gliose severa, está ligada a grande proliferação celular, rompimento dos domínios celulares e mudanças na morfologia do astrócito. Na gliose severa com formação de cicatriz glial, há a ocorrência de um processo inflamatório, bem como a deposição de matriz extracelular e a participação de outras células (Sofroniew & Vinters 2010).

Através do uso de roedores mutantes para a enzima Cistationa β -sintetase, a qual está envolvida na via de remetilização da Hcy, Tawfik e colaboradores (2014) promoveram uma situação de hiperhomocisteinemia, que comprometeu o desenvolvimento das células da retina, como a diminuição da vascularização e o aumento da

expressão da proteína GFAP nas células de Muller. Adicionalmente, assim como em nossos resultados, Roessmann e colaboradores (1980) em um estudo realizado com humanos, encontraram células positivas para proteína GFAP em células endoteliais em desenvolvimento, mas não em um período posterior (mais maduro). Levando a crer, que sua presença parece estar relacionada com o grau de diferenciação da camada endotelial. Contudo, na idade de E10, nossos resultados das quantificações de GFAP apontam para uma recuperação da homeostase celular dos astrócitos, pois os níveis desta proteína mostraram-se semelhantes aos do controle. Podemos supor então, que o processo de gliose reativa encontrado na idade de E6 foi revertido até a idade de E10, levando a crer que neste caso, o fator tempo foi necessário para uma recuperação tecidual.

Os fatores neurotróficos têm sido amplamente estudados por participarem de importantes mecanismos celulares como sobrevivência, diferenciação e manutenção das células neurais. A diminuição destes fatores, especificamente BDNF e GDNF tem sido implicados em algumas doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Hunot et al. 1996; Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar 2013; Nagata et al. 2015).

A diminuição dos níveis da neurotrofina BDNF em resposta aos elevados níveis de Hcy tem sido relatada mais recentemente na literatura. Embora esta relação e seu mecanismo de ação não tenham sido completamente elucidados, acredita-se que a alteração das reações de remetilização e transferência de grupamentos metil em condições de hiperhomocisteinemia, já citadas anteriormente, estejam influenciando na diminuição dos níveis desta neurotrofina (de Rezende & D'Almeida 2014). Esta mesma relação de elevados níveis de Hcy reduzindo a expressão de BDNF foi encontrada em nossos resultados para embriões em E6, e também pode ser confirmada através de estudos com roedores. Segundo Matté e colaboradores (2009), a administração de 0.6 $\mu\text{mol/g}$ de Hcy foi capaz de reduzir significativamente os níveis de BDNF em algumas áreas do cérebro, como hipocampo, mas não em outras – córtex frontal. Por consequência, esta redução foi capaz de alterar os mecanismos de memória a curto e longo prazo. Ademais, a administração preventiva de ácido fólico preveniu os efeitos nocivos da Hcy sobre BDNF, mostrando que a nutrição é um fator preponderante na homeostasia do SNC.

As quantificações para BDNF e GDNF mostraram-se diminuídas nos embriões em idade de E6 tratados com Hcy. Porém para a idade de E10 as quantificações de ambas neurotrofinas retomaram aos

níveis semelhantes aos do controle. Esta recuperação, sugere que as respostas celulares ocorrem de forma bastante rápida, ou seja, os níveis destas proteínas foram retomados neste curto espaço de tempo, provavelmente através dos processos de proliferação e diferenciação a que estão sujeitos os embriões.

Quando investigamos os efeitos da Hcy nas células do SNC através da análise ultraestrutural das células neurais, a Hcy mostrou principalmente alterações relacionadas a dilatação do espaço perinuclear nas três camadas celulares do mesencéfalo na idade embrionária de E6, e em todas análises na idade de E10. A dilatação do espaço perinuclear é relatada na literatura como uma modificação morfológica decorrente do processo de apoptose (Falcieri et al. 1994; Sakamoto et al. 2004), e pode ser decorrente do rearranjo do poro nuclear durante este processo de morte celular programada (Sakamoto et al. 2004). Igualmente, a presença de estruturas de aspecto vesicular com membrana no seu interior, foi encontrada nas duas idades de análise.

Com o intuito de comprovar se essas vesículas estariam relacionadas ao processo fisiológico de autofagia, procedemos com esta análise mediante a utilização do corante laranja de acridina. Como resultado, não obtivemos a comprovação deste processo, provavelmente por algumas limitações descritas na sequência. Este corante acidotrópico é frequentemente utilizado para a detecção de compartimentos celulares ácidos, como lisossomos, autofagossomos e membranas celulares relacionadas (Anderson & Orci 1988; Clerc & Barenholz 1998; Krolenko et al. 2006). O corante de acridina reage com o pH destes compartimentos e emite uma coloração verde em ambiente neutro, porém em ambiente ácido, sofre modificações e passa a emitir fluorescência vermelha, que pode ser quantificada por citometria de fluxo ou visualizada por microscopia de fluorescência (Anderson & Orci 1988). Além desta propriedade, a laranja de acridina possui alta afinidade de ligação ao DNA e RNA (Lauretti et al. 2003; Nafisi et al. 2007), o que pode ter influenciado na interpretação de nossos resultados, pois nossas marcações para autofagia por citometria de fluxo mostrou uma porcentagem de marcação elevada, cerca de 80% de reatividade ao corante na idade de E6 e cerca de 95% de marcação na idade E10. As marcações por citoquímica também não elucidaram nossa dúvida, pois como visto por microscopia de fluorescência, a marcação mostrou-se inespecífica, pois todo o tecido reagiu intensamente. Neste sentido, a utilização de marcadores mais específicos, como por exemplo proteínas específicas da membrana do autofagossomo, como a LC3 (Kabeya et al.

2000) podem comprovar a presença deste mecanismo nas células neurais expostas à Hcy.

6. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados mostram que a dose elevada de Hcy interferiu na proliferação celular, através da diminuição da expressão de fosfo-histona H3, p21 e ciclina-E e pelo aumento da expressão da proteína p53.

Em relação ao processo de apoptose, este não foi ativado pelas proteínas BCL2 e Bak nas duas idades analisadas.

Na análise de diferenciação glial a Hcy promoveu um aumento da expressão de GFAP na idade de E6, o que foi caracterizado como uma resposta celular de gliose reativa. Sendo que na idade de E10, essa expressão se normalizou no grupo exposto à Hcy. Em relação às células neuronais, a Hcy não interfere na diferenciação dos neurônios nas duas idades analisadas.

Quanto a sobrevivência neural, a Hcy induziu uma diminuição nos níveis das proteínas BDNF e GDNF na idade de E6, porém este quadro foi revertido até a idade de E10.

No que se refere a análise ultraestrutural, os embriões expostos à Hcy exibiram alterações relacionadas ao espaço perinuclear, diminuição da eletrondensidade celular e formação anômala de membranas.

A análise para autofagia não foi conclusiva, mediante a utilização do corante laranja de acridina.

7. REFERÊNCIAS

- Aerts, L.A. et al., 1993. Stereospecific in vitro embryotoxicity of l-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 7(6), pp.743–9.
- Alimentar, G., 2005. Promovendo a Alimentação Saudável Edição Especial. , pp.1–238.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D., 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), pp.287–93.
- Amur, S.G. et al., 1986. Correlation between inhibition of myelin basic protein (arginine) methyltransferase by sinefungin and lack of compact myelin formation in cultures of cerebral cells from embryonic mice. *Journal of neuroscience research*, 16(2), pp.367–76.
- Anderson, R.G. & Orci, L., 1988. A view of acidic intracellular compartments. *The Journal of cell biology*, 106(3), pp.539–43.
- Barres, B.A., 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60(3), pp.430–40.
- Bellairs, R. & Osmond, M., 2014. *Atlas of Chick Development*, Elsevier.
- Bhaumik, S.R., Smith, E. & Shilatifard, A., 2007. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature structural & molecular biology*, 14(11), pp.1008–16.
- Boardman, P.E. et al., 2002. A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Current biology : CB*, 12(22), pp.1965–9.
- Bottiglieri, T., 2005. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(7), pp.1103–1112.

- Bourckhardt, G.F. et al., 2015. Effects of homocysteine on mesenchymal cell proliferation and differentiation during chondrogenesis on limb development. *Journal of Applied Toxicology*, (June 2014), p.n/a–n/a.
- Brady, C. a & Attardi, L.D., 2010. P53 At a Glance. *Journal of cell science*, 123(Pt 15), pp.2527–32.
- Brady, S., Colman, D.R. & Brophy, P., 2014. *From Molecules to Networks*, Elsevier.
- Buffo, A., Rolando, C. & Ceruti, S., 2010. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical pharmacology*, 79(2), pp.77–89.
- Burda, J.E. & Sofroniew, M. V, 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), pp.229–48.
- Buss, R.R., Sun, W. & Oppenheim, R.W., 2006. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annual review of neuroscience*, 29, pp.1–35.
- Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P., 2008. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(2), pp.110–22.
- Cahoy, J.D. et al., 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(1), pp.264–78.
- Campbell, K. & Götz, M., 2002. Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences*, 25(5), pp.235–238.

- Chao, M. V., 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(4), pp.299–309.
- Chen, S.H. et al., 2012. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, protects dopaminergic neurons from neurotoxin-induced damage. *British journal of pharmacology*, 165(2), pp.494–505.
- Clarke, L.E. & Barres, B.A., 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(5), pp.311–21.
- Clerc, S. & Barenholz, Y., 1998. A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. *Analytical biochemistry*, 259(1), pp.104–11.
- Cohen-Cory, S. et al., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Developmental neurobiology*, 70(5), pp.271–88.
- Colas, J.F. & Schoenwolf, G.C., 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 221(2), pp.117–45.
- Dady, A., Blavet, C. & Duband, J.L., 2012. Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo. *Developmental Dynamics*, 241(8), pp.1333–1349.
- Dangour, A.D. et al., 2010. B-vitamins and fatty acids in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and dementia: a systematic review. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 22(1), pp.205–24.
- Domowicz, M.S. et al., 2011. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. *Brain research*, 1389, pp.35–49.

- Dupin, E., Creuzet, S. & Douarin, N.M. Le, 2000. The Contribution of the Neural Crest to the Vertebrate Body.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L., 2000. Glial Fibrillary Acidic Protein : GFAP-Thirty-One Years (1969 – 2000)*. , 25, pp.1439–1451.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25(9-10), pp.1439–51.
- Falcieri, E. et al., 1994. Ultrastructural features of apoptosis. *Scanning microscopy*, 8(3), pp.653–65; discussion 665–6.
- Frank, C.L. & Tsai, L.-H., 2009. Alternative functions of core cell cycle regulators in neuronal migration, neuronal maturation, and synaptic plasticity. *Neuron*, 62(3), pp.312–26.
- Gilbert, S.F., 2014. *Developmental Biology*, Sinauer.
- Gómez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M.L., 2013. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Current topics in behavioral neurosciences*, 15(Hebb 1949), pp.117–36.
- Gozes, I., 1982. Tubulin in the nervous system. *Neurochemistry International*, 4(2-3), pp.101–120.
- Guillemot, F., 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Progress in Neurobiology*, 83(1), pp.37–52.
- Hallböök, F., 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Current opinion in neurobiology*, 9(5), pp.616–21.
- Hamburger, V. & Hamilton, H., 1AD. Series o f. *Developmental Dynamics*, 88(1), pp.231–272.

- Hamburger, V. & Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 195(4), pp.231–72.
- Hatten, M.E., 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*, 22, pp.511–539.
- Hinterberger, M. & Fischer, P., 2013. Folate and Alzheimer: when time matters. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 120(1), pp.211–24.
- Hollyday, M., 2001a. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(2), pp.161–173.
- Hollyday, M., 2001b. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(2), pp.161–173.
- Huang, E.J. & Reichardt, L.F., 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 72, pp.609–42.
- Hunot, S. et al., 1996. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain: a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 103(8-9), pp.1043–52.
- Jiang, Y. et al., 2008. Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes. *The Journal of experimental biology*, 211(Pt 6), pp.911–20.
- Joerger, A.C. & Fersht, A.R., 2008. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual review of biochemistry*, 77, pp.557–82.

- Kabeya, Y. et al., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 19(21), pp.5720–8.
- Katsetos, C.D. et al., 2003. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of child neurology*, 18(12), pp.851–866; discussion 867.
- Kierszenbaum, A.L. & Tres, L., 2015. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, Elsevier Health Sciences.
- Kimelberg, H.K., 2004. The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45(2-3), pp.191–202.
- Kintner, C. & Koyano-Nakagawa, N., 2009. Neurogenesis in the Vertebrate Embryo. *Essentials of Stem Cell Biology*, 1, pp.157–167.
- Kirkpatrick, L.L. & Brady, S.T., 1999. Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton.
- Kobus, K. et al., 2013. Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 97(6), pp.386–397.
- Kobus, K., Nazari, E.M. & Müller, Y.M.R., 2009. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. *Histochemistry and cell biology*, 132(5), pp.525–32.
- Kossel, A.H. et al., 2001. A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), pp.14702–7.
- Krolenko, S.A. et al., 2006. Acridine orange accumulation in acid organelles of normal and vacuolated frog skeletal muscle fibres. *Cell biology international*, 30(11), pp.933–9.

- Kruman, I.I. et al., 2000. Homocysteine Elicits a DNA Damage Response in Neurons That Promotes Apoptosis and Hypersensitivity to Excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 20(18), pp.6920–6926.
- De La Calle, M. et al., 2003. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 107(2), pp.125–134.
- Laming, P.R. et al., 2000. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(3), pp.295–340.
- Latacha, K.S. & Rosenquist, T.H., 2005. Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 234(2), pp.323–31.
- Lauretti, F. et al., 2003. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of virological methods*, 114(1), pp.29–35.
- Lent, R., 2001. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência*, Atheneu.
- Lewin, G.R. & Barde, Y.-A., 1996. Physiology of the Neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience*, 19(1), pp.289–317.
- Lindsay, R.M. et al., 1994. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends in neurosciences*, 17(5), pp.182–90.
- Lipton, S. a et al., 1997. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), pp.5923–5928.

- Liu, W.-F. et al., 2006. DNA damage checkpoint, damage repair, and genome stability. *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica*, 33(5), pp.381–90.
- Loureiro, S.O. et al., 2010. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain research*, 1355, pp.151–64.
- Lucock, M., 2000. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism*, 71(1-2), pp.121–138.
- Maestro de las Casas, C. et al., 2003. High exogenous homocysteine modifies eye development in early chick embryos. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 67(1), pp.35–40.
- Mandarim-de-lacerda, C. a, 2003. Redalyc.Stereological tools in biomedical research. , 75, pp.469–486.
- Martínez-Carpio, P. a. & Navarro Moreno, M. a., 2003. Factores de crecimiento, lesión celular, proteincinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores: su relevancia en la patología molecular del cáncer humano. *Medicina Clínica*, 120(7), pp.265–271.
- Matté, C. et al., 2009. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunocontent: prevention by folic acid treatment. *Neuroscience*, 163(4), pp.1039–45.
- Mattson, M.P. & Shea, T.B., 2003. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, 26(3), pp.137–146.
- McCully, K.S., 2009. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Annals of clinical and laboratory science*, 39(3), pp.219–32.

- McCully, K.S., 1969. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American journal of pathology*, 56(1), pp.111–128.
- Van Mil, N.H., Oosterbaan, A.M. & Steegers-Theunissen, R.P.M., 2010. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: A review. *Reproductive Toxicology*, 30(4), pp.520–531.
- Miller, A.L., 2008. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 13(3), pp.216–26.
- Miller, R.R. et al., 2003. Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(3), pp.521–532.
- Miyashita, T. et al., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9(6), pp.1799–805.
- Montgomery, D.L., 1994. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Veterinary pathology*, 31(2), pp.145–167.
- Moore, K.L. & Persaud, T.V.N., 2008. *Embriologia Clinica*, Elsevier (medicina).
- Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, 116(1), pp.201–11.
- Muotri, A.R. & Gage, F.H., 2006. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*, 441(7097), pp.1087–93.

- Nafisi, S. et al., 2007. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 827(1-3), pp.35–43.
- Nagata, T. et al., Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, 5(1), pp.64–73.
- Obeid, R. & Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Letters*, 580(13), pp.2994–3005.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A. & Nedergaard, M., 2012. Astrocytes. , 814, pp.23–45.
- Oikawa, S., Murakami, K. & Kawanishi, S., 2003. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene*, 22(23), pp.3530–8.
- Oldreive, C.E. & Doherty, G.H., 2007. Neurotoxic effects of homocysteine on cerebellar Purkinje neurons in vitro. *Neuroscience Letters*, 413(1), pp.52–57.
- Oosterbaan, A.M., Steegers, E.A.P. & Ursem, N.T.C., 2012. The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. *Microvascular research*, 83(2), pp.98–104.
- Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience*, 14, pp.453–501.
- Oppenheim, R.W. et al., 1995. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*, 373(6512), pp.344–6.

- Pekny, M., Wilhelmsson, U. & Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience letters*, 565, pp.30–8.
- Pettmann, B. & Henderson, C.E., 1998. Neuronal cell death. *Neuron*, 20(4), pp.633–47.
- Pietenpol, J.A. & Stewart, Z.A., 2002. Cell cycle checkpoint signaling : Cell cycle arrest v ersus apoptosis. , 182, pp.475–481.
- Pitanga, B.P.S. et al., 2012. The Role of Astrocytes in Metabolism and Neurotoxicity of the Pyrrolizidine Alkaloid Monocrotaline, the Main Toxin of *Crotalaria retusa*. *Frontiers in pharmacology*, 3, p.144.
- Poddar, R. & Paul, S., 2009. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. *Journal of neurochemistry*, 110(3), pp.1095–106.
- Polo, S.E. & Almouzni, G., 2005. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer letters*, 220(1), pp.1–9.
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(1), pp.24–32.
- Rakic, P., 1988. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Progress in brain research*, 73, pp.15–37.
- Rakic, P., 2003. Elusive radial glial cells: Historical and evolutionary perspective. *Glia*, 43(1), pp.19–32.
- Redies, C., 2000. Cadherins in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 61(6), pp.611–648.
- Reynolds, E., 2006. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology*, 5(11), pp.949–960.

- De Rezende, M.M. & D'Almeida, V., 2014. Central and systemic responses to methionine-induced hyperhomocysteinemia in mice. *PloS one*, 9(8), p.e105704.
- Roessmann, U. et al., 1980. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain research*, 200(1), pp.13–21.
- Rosenquist, T.H., Ratashak, S.A. & Selhub, J., 1996. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pp.15227–32.
- Sachdev, P.S., 2005. Homocysteine and brain atrophy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(7), pp.1152–1161.
- Sadler, T.W., 2007. *Langman embriología médica: con orientación clínica*, Ed. Médica Panamericana.
- Sakamoto, M.K. et al., 2004. Sequential morphological changes of erythrocyte apoptosis in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 279(1), pp.652–63.
- Sandhu, J.K. et al., 2009. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiology of disease*, 33(3), pp.405–14.
- Sauvageot, C.M. & Stiles, C.D., 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(3), pp.244–249.
- Saw, S.-M. et al., 2001. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am J Clin Nutr*, 73(2), pp.232–239.

- Schoenwolf, G., 2011. *Larsen Embriologia Humana*, Elsevier Health Sciences Brazil.
- Schoenwolf, G.C., 1995. The Avian Embryo" A Model for Descriptive and Experimental Embryology. *Cell*.
- Schoenwolf, G.C. & Smith, J.L., 1990. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development (Cambridge, England)*, 109(2), pp.243–70.
- Schuurmans, C. & Guillemot, F., 2002. Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(1), pp.26–34.
- Schwartz, D. & U, V.R., 1998. p53-dependent cell cycle control : response to genotoxic stress. , 8.
- Selhub, J., 2008. Public health significance of elevated homocysteine. *Food and Nutrition Bulletin*, 29(2 SUPPL.), pp.116–125.
- Shapiro, L. & Colman, D.R., 1999. The Diversity of Cadherins and Implications for a Synaptic Adhesive Code in the CNS. *Neuron*, 23(3), pp.427–430.
- Sidman, R.L., Miale, I.L. & Feder, N., 1959. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental Neurology*, 1(4), pp.322–333.
- Sidman, R.L. & Rakic, P., 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research*, 62(1), pp.1–35.
- Silver, J. & Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(2), pp.146–56.
- Smith, J.L. & Schoenwolf, G.C., 1997. Neurulation: Coming to closure. *Trends in Neurosciences*, 20(11), pp.510–517.

- Smithells, R.W. et al., 1981. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Archives of disease in childhood*, 56(12), pp.911–918.
- Sobeih, M.M. & Corfas, G., 2002. Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 20(3-5), pp.349–357.
- Sofroniew, M. V & Vinters, H. V, 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), pp.7–35.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S. & Caviness, V.S., 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(9), pp.6046–57.
- Tawfik, A. et al., 2014. Alterations of retinal vasculature in cystathionine- β -synthase heterozygous mice: a model of mild to moderate hyperhomocysteinemia. *The American journal of pathology*, 184(9), pp.2573–85.
- Thiagalingam, S. et al., 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 983, pp.84–100.
- Ueland, P.M. et al., 1993. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clinical chemistry*, 39(9), pp.1764–79.
- Waterland, R.A., 2006. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *The Journal of nutrition*, 136(6 Suppl), p.1706S–1710S.
- Wilcken, D.E. & Wilcken, B., 1976. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 57(4), pp.1079–82.

- Xu, L. et al., 2015. Crosstalk of homocysteinylation, methylation and acetylation on histone H3. *The Analyst*, 140(9), pp.3057–63.
- Yang, Y. et al., 2011. Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia*, 59(2), pp.200–7.
- Yao, L., Zhang, D. & Bernd, P., 1994. The onset of neurotrophin and trk mRNA expression in early embryonic tissues of the quail. *Developmental biology*, 165(2), pp.727–30.
- Young, S.N., 2007. Folate and depression--a neglected problem. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 32(2), pp.80–2.
- Zhang, Y. & Xiong, Y., 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523), pp.1910–5.
- Zhou, S., Zhang, Z. & Xu, G., 2014. Notable epigenetic role of hyperhomocysteinemia in atherogenesis. *Lipids in health and disease*, 13(1), p.134.
- Zilfou, J.T. & Lowe, S.W., 2009. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), p.a001883.
- Zou, C.G. et al., 2010. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiology of Aging*, 31(12), pp.2069–2079.